

VNiVERSiDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MEDiCiNA
VNiDAD DE MEDiCiNA MOLECULAR



TESiS DOCTORAL
NVEVAS APORTACIONES A LA CARACTERiZACiÓN
MOLECULAR DE LOS GLiOMAS

iRENE RODRiGVEZ HERNÁNDEZ

2013



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**



EL DR. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Nuevas aportaciones a la caracterización molecular de los gliomas”, que presenta la Licenciada en Farmacia Irene Rodríguez Hernández, ha sido realizado bajo su dirección en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca, a 19 de Marzo de 2013.

Fdo. Prof. Dr. Rogelio González Sarmiento

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2007-66394), el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI10/00219) y la Junta de Castilla y León (grupo de excelencia GR-15).

Durante el transcurso de este trabajo, Irene Rodríguez Hernández ha sido beneficiaria de un contrato predoctoral de Personal Investigador en Formación de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo (Orden EDU/330/2008).

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de este trabajo. A mi director de tesis, el profesor Rogelio González Sarmiento, por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de su grupo, por sus enseñanzas y apoyo constante tanto profesional como personalmente, por ser mucho más que un director de tesis. A los doctores Juan Gómez Moreta, Juan Luis García y Ángel Santos Briz por todo lo que he aprendido a su lado, por toda su ayuda, dedicación e implicación en el desarrollo de este trabajo. Al Dr. Javier Martín Vallejo y el Máster de Análisis Avanzado de Datos Multivariante que han hecho que el mundo de la estadística sea mucho más sencillo y divertido. Al Dr. Pedro Lazo y Marta Vázquez por su colaboración en este trabajo. Al laboratorio 7 y a Isidro, por estar siempre ahí. A todos mis compañeros de Medicina y del laboratorio 14, los presentes y los que ya marcharon, a los que han estado siempre, por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por hacer cada día más agradable a pie de poyata en esta gran familia. A Nieves y Estrella, por su toda ayuda y sus buenos consejos, por mantenerlo todo en orden. A mis amigos de siempre, por estar ahí durante todos estos años en todo momento, por acompañarme a lo largo de este trabajo con tanta alegría e ilusión. A mis padres y a mi hermano, por su confianza y cariño diario, por haberme enseñado tantas cosas, y por su apoyo incondicional en todo aquello que hago. A Luis, gracias por ilusionarme y darme fuerzas cada día, por todo lo que compartimos, porque nadie nos dijo que sería fácil pero tampoco imposible.

INTRODUCCIÓN.....	13
1. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE SNC.....	16
2. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LOS TUMORES DE SNC	17
3. TUMORES ASTROCÍTICOS.....	19
4. BASES GENÉTICAS DEL DESARROLLO Y PROGRESIÓN TUMORAL DE LOS ASTROCITOMAS	22
5. RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE P53	25
5.1. P53.....	25
5.2. P63.....	28
5.3. VRKs.....	30
6. RUTA DE SEÑALIZACIÓN EGFR/PI3K/PTEN/RAS	32
6.1. EGFR.....	32
6.2. PI3K.....	33
6.3. PTEN.....	35
6.4. BRAF.....	37
7. IDH1 E IDH2.....	38
8. REPARACIÓN DEL DNA	40
8.1. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS	41
8.2. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES	42
8.3. REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA	44
8.4. REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS.....	46
9. EPIGENÉTICA	50
9.1. METILACIÓN DEL DNA.....	50
9.2. MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE LAS HISTONAS	52
9.3. microRNAs.....	54
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	57

MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. PACIENTES Y MUESTRAS	63
1.1. Extracción de DNA	63
1.2. Extracción de RNA	64
1.3. Extracción de proteínas	65
2. ANÁLISIS DE MUTACIONES	65
2.1. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR	65
2.2. RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction)	69
2.3. Electroforesis en gel de agarosa	71
2.4. Electroforesis sensible a la conformación (CSGE-heterodúplex)	71
2.5. Cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturizante (dHPLC)	73
2.6. Secuenciación automática	73
3. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS	74
3.1. Discriminación alélica mediante PCR-RFLP	74
3.2. Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan	76
4. PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA	78
5. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES	80
6. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DE REGIONES PROMOTORAS MEDIANTE MS-MLPA	81
7. CLONACIÓN EN VECTORES DE EXPRESIÓN	84
8. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA	87
9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	89
9.1. Inmunohistoquímica	89
9.2. Electroforesis de proteínas y Western blot	90
10. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH)	91
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	92

12. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	94
RESULTADOS	97
1. CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES MOLECULARES RELACIONADAS CON EL DESARROLLO Y LA EVOLUCIÓN DE LOS ASTROCITOMAS	99
1.1. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN P53.....	101
1.2. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN P63.....	107
1.3. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN VRKs.....	108
1.4. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN EGFR.....	111
1.5. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN PI3KCA.....	115
1.6. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN PTEN	117
1.7. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN BRAF	124
1.8. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN IDH1 E IDH2	125
1.9. RESUMEN DE LAS PRINCIPALES ALTERACIONES IMPLICADAS EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS.....	127
2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES REPARADORES DEL DNA EN ASTROCITOMAS.....	132
2.1. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL SISTEMA NER	134
2.2. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL SISTEMA BER	136
2.3. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL SISTEMA DSBR.....	137
2.4. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL SISTEMA MMR	137
2.5. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS	138
3. CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES EN EL SISTEMA DE REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS EN ASTROCITOMAS	140
4. CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN ASTROCITOMAS	151

4.1. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DE MGMT	151
4.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE HDACs.....	152
5. ÍNDICE PRONÓSTICO	156
DISCUSIÓN.....	159
1. ALTERACIONES GENÉTICAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE LOS ASTROCITOMAS.....	161
1.1. IMPLICACIÓN DE LA RUTA DEL GEN TP53 EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS	162
1.2. IMPLICACIÓN DE LA RUTA EGFR/PI3K/PTEN/RAS EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS	167
1.3. IMPLICACIÓN DE LOS GENES IDH1 E IDH2 EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS	172
1.4. PERFILES MOLECULARES DE LOS ASTROCITOMAS	173
2. POLIMORFISMOS EN GENES REPARADORES DEL DNA ASOCIADOS CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE ASTROCITOMAS	176
3. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA MMR EN EL DESARROLLO DE LOS ASTROCITOMAS	180
4. IMPLICACIÓN DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS	184
4.1. VALOR PREDICTIVO DE MGMT EN ASTROCITOMAS	184
4.2. IMPLICACIÓN DE LAS HDACs EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS	185
5. FACTORES PRONÓSTICO DE LOS ASTROCITOMAS.....	187
CONCLUSIONES.....	189
BIBLIOGRAFÍA.....	193

INTRODUCCIÓN

La glía es el tejido conectivo especializado del sistema nervioso central (SNC) encargado del mantenimiento, protección y nutrición de las neuronas. Existen tres tipos de células gliales: los astrocitos, los oligodendrocitos y las células del epéndimo. Los astrocitos tienen forma estrellada y se encargan de proporcionar soporte físico a las neuronas y fagocitar los desechos del cerebro, los oligodendrocitos proporcionan soporte a los axones y producen la vaina de mielina que aísla a la mayoría de los axones entre sí, y las células del epéndimo revisten el conducto central de la médula espinal y los ventrículos cerebrales.

Una vez que el sistema nervioso se ha desarrollado completamente, las neuronas pierden su capacidad de dividirse y diferenciarse, mientras que las células gliales mantienen la capacidad de proliferar a lo largo de la vida. Por ello, la mayor parte de los tumores neurológicos en adultos son de origen glial, denominándose genéricamente gliomas (1, 2).

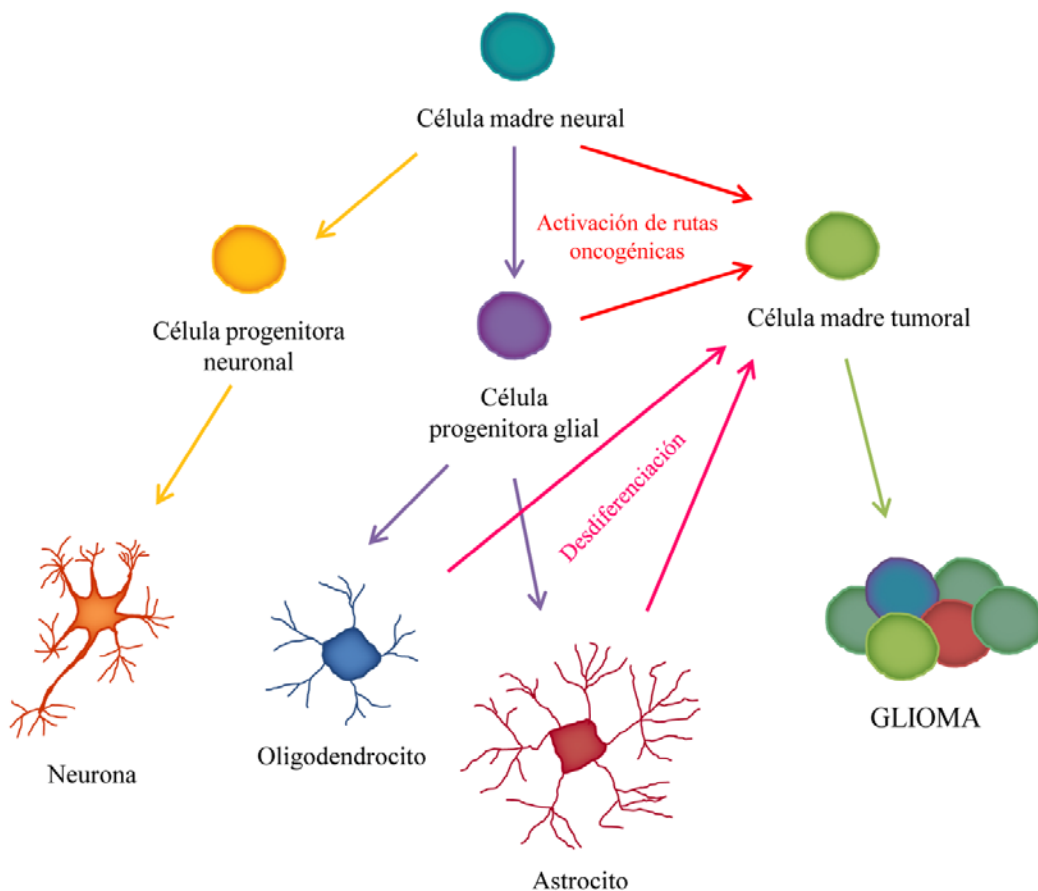


Figura 1. Esquema del desarrollo de las células neuroectodermales y del proceso de gliomagénesis.

Los modelos de gliomagénesis clásicos postulaban que las células tumorales cerebrales derivaban de la transformación de células neurales maduras como astrocitos, oligodendrocitos o neuronas maduras, o a partir de células precursoras indiferenciadas que sufrían diversas alteraciones genéticas (3). En la actualidad, se ha sugerido que los gliomas pueden originarse a partir de células madre tumorales derivadas de células madre neurales, células progenitoras o a partir de la dediferenciación de células neurales maduras debido a la activación de distintas rutas oncogénicas (Figura 1) (4, 5).

1. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE SNC

En la actualidad, se conocen más de 120 tipos de tumores cerebrales según la National Brain Tumor Society. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una clasificación de los tumores de SNC en función de su histología y su grado de malignidad (Tabla 1) (6).

El grado de malignidad está determinado por el nivel de diferenciación del tumor, la presencia o no de núcleos atípicos, la actividad mitótica, el grado de proliferación endotelial y la presencia de zonas de necrosis; y predice el comportamiento biológico del tumor, su respuesta a terapia y la evolución del paciente (6). Así, los tumores de grado I normalmente tienen un comportamiento benigno, con bajo potencial proliferativo y, en la mayoría de los casos, pueden ser eliminados completamente con cirugía. Los tumores de grado II son generalmente infiltrantes y, aunque tienen baja actividad proliferativa, suelen recurrir y tienden a progresar a grados mayores de malignidad. Los tumores de grado III son tumores con clara evidencia histológica de malignidad, incluyen núcleos atípicos y poseen elevada actividad mitótica. Y por último, los tumores de grado IV son los de mayor grado de malignidad, muy activos mitóticamente, con proliferación vascular, regiones de necrosis y altamente infiltrantes extendiéndose rápidamente por los tejidos adyacentes.

Tabla 1. Clasificación de la OMS de los tumores de SNC más frecuentes.

TUMORES NEUROEPITELIALES	Tumores embrionarios
Tumores astrocíticos	Meduloblastoma (grado IV)
Astrocitoma pilocítico (grado I)	Tumores neuroectodermales primitivos del SNC (PNET) (grado IV)
Astrocitoma difuso (grado II)	Tumor rabdoide/teratoide atípico (grado IV)
Astrocitoma anaplásico (grado III)	TUMORES DE LOS NERVIOS CRANEALES Y PARAESPINALES
Glioblastoma multiforme (grado IV)	Schwannoma (grado I)
Astrocitoma subependimario de células gigantes (grado I)	Neurofibroma (grado I)
Xantastrocitoma pleomórfico (grado II)	Perineurioma (grado I, II y III)
Tumores oligodendrogliales	Tumor de la vaina nerviosa periférica maligno (MPNST) (grado II, III y IV)
Oligodendroglioma (grado II)	TUMORES DE LAS MENINGES
Oligodendroglioma anaplásico (grado III)	Meningioma (grado I)
Tumores oligoastrocíticos	Meningioma atípico (grado II)
Oligoastrocitoma (grado II)	Meningioma anaplásico (grado III)
Oligoastrocitoma anaplásico (grado III)	Hemangiopericitoma (grado II)
Tumores ependimales	Hemangiopericitoma anaplásico (grado III)
Subependimoma (grado I)	Hemangioblastoma (grado I)
Ependimoma mixopapilar (grado I)	
Ependimoma (grado II)	
Ependimoma anaplásico (grado III)	

2. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LOS TUMORES DE SNC

Los tumores primarios malignos de SNC representan aproximadamente el 2% de todos los tumores humanos (datos GLOBOCAN 2008) (7). La incidencia anual en los países occidentales y Norteamérica es de aproximadamente 6-11 casos por cada 100000 habitantes en hombres y de 4-11 casos nuevos en mujeres (8). En las últimas décadas se ha producido un aumento de la incidencia y mortalidad de este tipo de tumores, principalmente entre niños y ancianos, debido en gran parte a las mejoras en la detección de estos tumores con las técnicas de diagnóstico de imagen. En España, la tasa de incidencia de tumores malignos de SNC es de 8.1 en hombres y 5.4 en mujeres por cada 100000 habitantes (datos EUCAN 2008, IARC *International agency for research on cancer*).

La incidencia de tumores cerebrales malignos es mayor en hombres que en mujeres, mientras que las mujeres presentan una mayor incidencia de tumores cerebrales no malignos, principalmente meningiomas (9). La distribución de los distintos tipos de tumores varía también según el grupo de edad. Así, los meduloblastomas y los gliomas de bajo grado son los tumores cerebrales pediátricos más frecuentes, mientras que en adultos los tumores más comunes son los meningiomas y los gliomas de alto grado (9). Además, existen diferencias en cuanto a la raza, siendo más frecuentes los gliomas malignos en personas de raza blanca que negra (2).

La etiología de estos tumores es, en general, desconocida. Los factores de riesgo clásicos como el tabaco, el alcohol, la dieta o factores de riesgo ocupacionales no parecen tener relación con este tipo de tumores (8-10). El único factor de riesgo claramente establecido es la exposición a radiación ionizante (8-11). Recientemente se ha relacionado la exposición excesiva a los campos electromagnéticos producidos por los teléfonos móviles con la aparición de tumores cerebrales, aunque esta asociación no es concluyente (12).

Existe una predisposición genética a desarrollar tumores cerebrales en familias portadoras de mutaciones germinales en genes asociados a síndromes hereditarios poco frecuentes. Entre ellos se encuentran el síndrome de Li-Fraumeni (mutaciones en el gen *TP53*), la neurofibromatosis tipo 1 y 2 (genes *NF1* y *NF2*), la esclerosis tuberosa 1 y 2 (genes *TSC1* y *TSC2*), el retinoblastoma (gen *RB*), el síndrome de Von Hippel-Lindau (gen *VHL*), el síndrome de Lynch (genes del sistema de reparación MMR) o el síndrome de Cowden (mutaciones en *PTEN*) (13-15). Sin embargo, únicamente el 5% de los pacientes con tumores de SNC tienen una historia familiar y, en la mayoría de los casos, no han sido identificadas las causas genéticas (2).

Se han descrito también diversos polimorfismos en genes implicados en procesos de reparación del DNA (*ERCC1*, *ERCC2*, *PRKDC*, *MGMT* o *XRCC7*), metabolismo de carcinógenos (*CYP2D6* o *GSTT1*) o en la regulación del ciclo celular (*MDM2*, *TP53* o *CDKN2B*) relacionados con el desarrollo de gliomas (8-10, 16).

3. TUMORES ASTROCÍTICOS

Los tumores de origen neuroepitelial engloban un subgrupo de neoplasias conocidas como gliomas, que derivan de las células de la glía necesarias para el mantenimiento, protección y nutrición de las neuronas. Los gliomas representan el 30% de todos los tumores intracraneales y el 80% de los tumores cerebrales malignos (17). Los astrocitomas son los gliomas más frecuentes en el adulto (más del 80%), y comprenden tanto tumores con bajo grado de proliferación e infiltración a los tejidos adyacentes como tumores altamente agresivos. Todos ellos presentan una elevada heterogeneidad morfológica y genética que aumenta a medida que la anaplasia se hace mayor, son bastante resistentes al tratamiento con radio y quimioterapia y, en general, tienen un pronóstico desfavorable.

Astrocitoma Pilocítico (grado I): es el tumor cerebral más frecuente en la infancia con una edad media de aparición entre los 15-20 años. La mayor parte de estos tumores se eliminan completamente con cirugía y responden bien a tratamientos de radio y quimioterapia. Tienen un pronóstico muy bueno, con una supervivencia mayor del 95% a los 10 años (18).

Astrocitoma Difuso de Bajo Grado (grado II): representa aproximadamente el 5-10% de los gliomas. Se desarrolla en adultos jóvenes entre los 30-45 años y puede localizarse en cualquier parte del SNC, aunque muestra preferencia por los hemisferios cerebrales. Son tumores bien diferenciados pero tienden a infiltrarse difusamente en las estructuras cerebrales circundantes (Figura 2). Se caracterizan por un crecimiento lento pero continuo que normalmente evoluciona a astrocitomas de mayor grado de malignidad (astrocitoma anaplásico o glioblastoma), asociado a la acumulación de diversas alteraciones genéticas (6, 19). El tratamiento estándar es la extirpación quirúrgica del tumor y posterior tratamiento con radioterapia (20). En el caso de los astrocitomas de bajo grado que recurren y comienzan a progresar a formas más malignas se tratan además con quimioterapia (temozolamida o PCV), pero presentan una tasa de respuesta baja (21). La supervivencia media de estos pacientes es de 5-10 años (18).

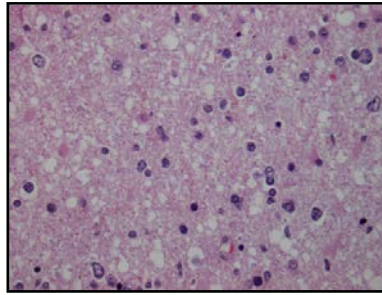


Figura 2. Astrocitoma de bajo grado (tinción hematoxilina-eosina).

Astrocitoma Anaplásico (grado III): constituye el 10-15% de los gliomas adultos. Se considera una progresión del astrocitoma de bajo grado, aunque en la mayoría de los casos se diagnostica sin que se detecte el tumor precursor. Se desarrolla también en cualquier parte del SNC, mostrando predilección por los hemisferios cerebrales, y suele aparecer en torno a los 45-50 años (6). Estos tumores son altamente infiltrantes y muestran una gran heterogeneidad morfológica con núcleos atípicos y una elevada actividad mitótica (Figura 3). El tratamiento general de los astrocitomas anaplásicos es la resección completa del tumor mediante cirugía y posterior tratamiento con radioterapia y temozolamida, siguiendo protocolos similares a los estándares establecidos para el tratamiento de los glioblastomas (22, 23), aunque el uso y beneficio del tratamiento con quimioterapia en estos pacientes no está del todo claro (2, 24). Independientemente del tratamiento elegido, más del 80% de los astrocitomas anaplásicos tienden a recurrir y a progresar a glioblastomas, y presentan una mediana de supervivencia de 1.5-2 años (18).

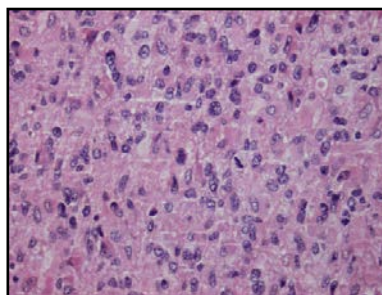


Figura 3. Astrocitoma anaplásico (tinción hematoxilina-eosina).

Glioblastoma Multiforme (grado IV): es el tumor más frecuente y más agresivo de SNC. Representa el 20% de todos los tumores intracraneales y el 60% de los gliomas. Los glioblastomas son tumores muy heterogéneos, presentan una

proliferación celular incontrolada, focos de necrosis, gran capacidad de angiogénesis, resistencia a la apoptosis, una alta inestabilidad genética y tienen una elevada capacidad de infiltrarse por todo el cerebro (Figura 4) (25). Son los astrocitomas de mayor grado de malignidad con una supervivencia media de un año tras su diagnóstico (18). El tratamiento de estos tumores consiste en la máxima extirpación tumoral posible a pesar del elevado grado de infiltración, y posterior tratamiento con radioterapia y temozolamida (22, 23).

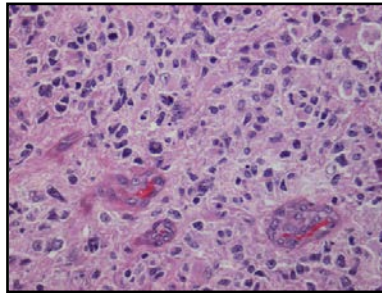


Figura 4. Glioblastoma multiforme (tinción hematoxilina-eosina).

Existen dos subtipos de glioblastomas: los glioblastomas primarios surgen *de novo* en ausencia de lesiones preexistentes, mientras que los secundarios se desarrollan progresivamente desde un astrocitoma de bajo grado, generalmente durante un periodo de 5 a 10 años (18, 26). Aunque histológica y clínicamente son indiferenciables y poseen similar pronóstico, la edad de aparición y las alteraciones genéticas que presentan son diferentes. Los glioblastomas primarios representan más del 90% de los casos y se desarrollan rápidamente tras una corta historia clínica en pacientes de 60-65 años. En cambio, los glioblastomas secundarios se desarrollan en personas más jóvenes, de 40-45 años, son muy poco frecuentes (<10%) y presentan alteraciones genéticas similares a los astrocitomas de bajo grado y anaplásicos (26, 27). La baja frecuencia de glioblastomas secundarios puede deberse a la elevada mortalidad de los pacientes con astrocitomas de menor grado, que fallecen antes de la progresión de la enfermedad (18).

4. BASES GENÉTICAS DEL DESARROLLO Y PROGRESIÓN TUMORAL DE LOS ASTROCITOMAS

Más del 90% de los astrocitomas son esporádicos y no tienen relación con ninguno de los síndromes familiares debidos a mutaciones en genes de alta penetrancia (16). Los astrocitomas son el resultado de la acumulación secuencial de alteraciones genéticas y la desregulación de diferentes rutas de señalización (2, 25).

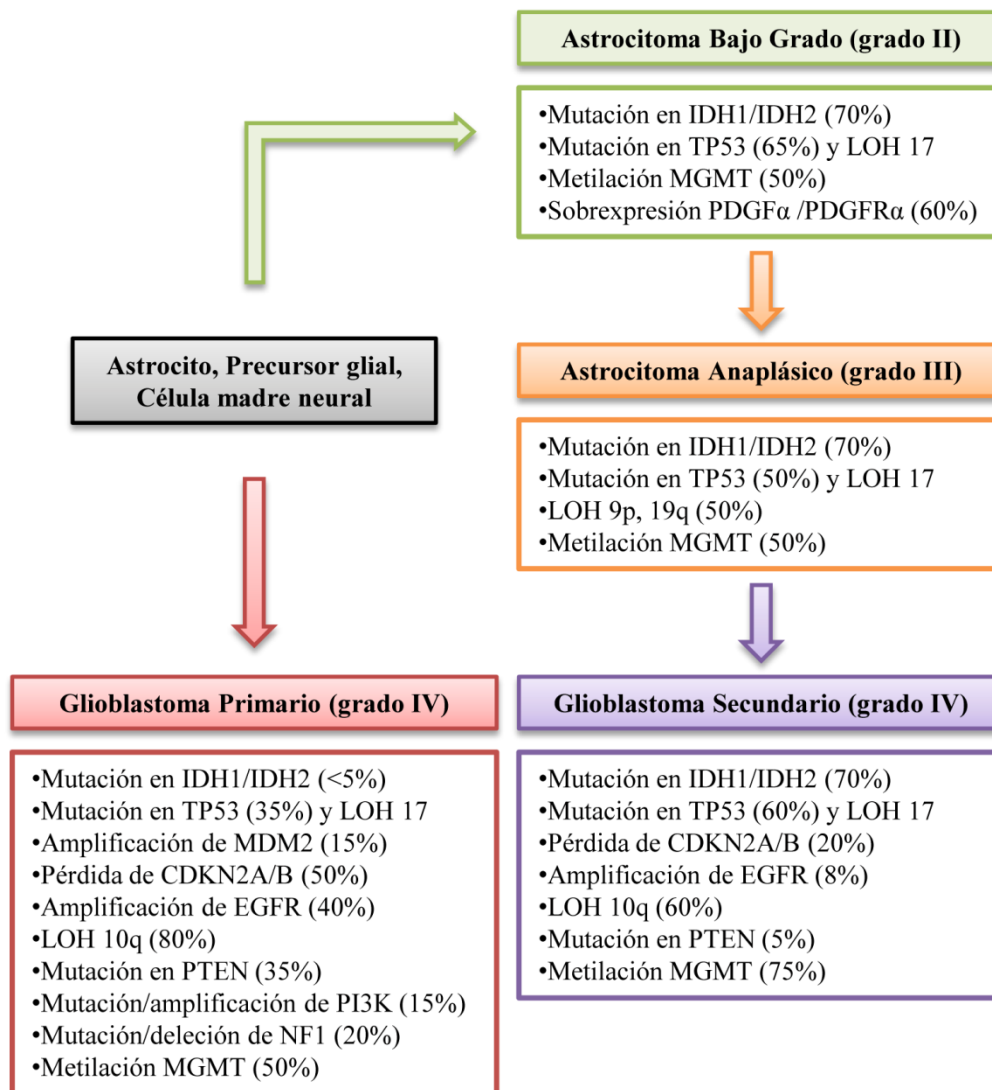


Figura 5. Principales alteraciones implicadas en el desarrollo y progresión de los tumores astrocíticos.

La mayor parte de las alteraciones se encuentran en rutas que regulan procesos de proliferación celular, supervivencia (apoptosis y necrosis), invasión, angiogénesis y metabolismo celular (16, 25), y pueden ser debidas tanto a mecanismos genéticos como

epigenéticos, entre los que se incluyen mutaciones genéticas, amplificaciones o deleciones cromosómicas, alteraciones en el estado de metilación, niveles de microRNAs, etc. (28). Los genes alterados y el orden en el que se alteran normalmente se correlacionan con el grado clínico y el tipo de tumor (Figura 5).

Más del 60% de los astrocitomas de bajo grado, anaplásicos y glioblastomas secundarios presentan mutaciones en el gen *TP53* que pueden estar asociadas a pérdidas de heterocigosidad del cromosoma 17 (29), lo que sugiere que las alteraciones en este gen están involucradas en fases tempranas del desarrollo de estos tumores (1, 18). La vía de señalización mediada por RAS/RAF se encuentra también relacionada con el desarrollo de los astrocitomas de bajo grado a través de la sobreexpresión del receptor tirosina quinasa PDGFR α y su ligando PDGF α en más del 60% de los casos, mientras que la presencia de mutaciones somáticas activantes en genes de la ruta RAS/RAF son muy poco frecuentes (30). Sin embargo, se han identificado en astrocitomas pilocíticos aumentos en el número de copias del gen *BRAF* y reordenamientos intracromosómicos que generan una nueva proteína oncogénica de fusión, KIAA1549:BRAF, activa constitutivamente (31).

Las rutas implicadas en el metabolismo celular también se encuentran alteradas en los astrocitomas de bajo grado, anaplásicos y glioblastomas secundarios. Más del 70% de los casos presentan mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*, que están relacionadas con un mejor pronóstico de los pacientes independientemente del grado del tumor (27, 32). Estas mutaciones probablemente constituyan un evento temprano en el desarrollo tumoral (33) y suelen estar asociadas a otras alteraciones frecuentes en tumores de bajo grado como las mutaciones en *TP53* (32, 34).

La pérdida del brazo largo del cromosoma 10 (10q) es la alteración más común asociada tanto a glioblastomas primarios (80%) como secundarios (60%). Sin embargo, las mutaciones en el gen *PTEN*, localizado en 10q, se producen en más del 30% de los glioblastomas primarios y apenas en los secundarios (4%) (26, 35). Las pérdidas o mutaciones de *PTEN* son alteraciones poco frecuentes en los astrocitomas de bajo grado, lo que sugiere que su pérdida no favorece el crecimiento en los estadios iniciales del tumor sino que, por el contrario, favorece la progresión tumoral (36).

El 40% de los glioblastomas primarios se caracteriza por la amplificación del gen *EGFR* (26) y el 20% expresa una proteína truncada y activa constitutivamente, EGFRvIII, que carece del dominio extracelular de unión a ligando. La mitad de los tumores que expresan EGFRvIII presentan también sobreexpresión de *EGFR* (25, 37).

La pérdida de expresión del locus *CDKN2A* (gen que codifica p16 y ARF) puede deberse tanto a deleciones homocigotas como a la metilación de la región promotora, y es más frecuente en los glioblastomas primarios (50%) que en los secundarios (20%), mientras que las mutaciones en el gen *TP53* aparecen con menor frecuencia (<35%) en los glioblastomas primarios (19, 38). La pérdida de *CDKN2A* afectaría tanto a la función de p16 como de ARF desregulando así las rutas de RB y p53 respectivamente (33). Además, las alteraciones en *CDKN2A* están asociadas con la amplificación de *EGFR* y son excluyentes de las mutaciones en el gen *TP53* (39).

Aproximadamente el 50% de los glioblastomas primarios y más del 70% de los secundarios presentan hipermetilación de la región promotora del gen *MGMT* que conlleva el silenciamiento del gen, lo que hace a estos tumores más sensibles al tratamiento con temozolamida (40, 41). La metilación de *MGMT* también se ha observado en un alto porcentaje de astrocitomas de menor grado asociado a un mejor pronóstico (42).

Recientemente se ha establecido una nueva clasificación molecular de los glioblastomas dividiéndolos en clásicos, mesenquimales y proneurales en base a sus perfiles de expresión y alteraciones genéticas (43). El subtipo clásico está caracterizado por la amplificación de *EGFR* y la deleción del cromosoma 10, y es el que mejor responde al tratamiento con radioterapia y temozolamida. El subtipo mesenquimal se caracteriza por la presencia de mutaciones o deleciones del gen *NFI*, la expresión de marcadores mesenquimales como *CHI3L1*, y presenta una respuesta parcial al tratamiento. Por último, el subtipo proneural se desarrolla en pacientes jóvenes, está asociado a la sobreexpresión de $PDGFR\alpha$, mutaciones en los genes *IDH1* y *TP53* y, en general, presenta resistencia al tratamiento con radioterapia y temozolamida (38, 43).

5. RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE P53

5.1. P53

El gen *TP53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica una proteína de 393 aminoácidos cuya actividad principal es actuar como factor de transcripción. Es conocido como el “guardián del genoma” por su papel en la prevención de la acumulación de alteraciones genéticas mediante la inducción de la reparación de daños en el DNA, la inducción de la parada del ciclo celular mientras se repara el daño, o la muerte celular por apoptosis si el daño es tan severo que resulte imposible su reparación (44, 45).

La proteína p53 consta de cuatro dominios funcionales clave para regular la respuesta celular frente a daños en el DNA (46, 47). El dominio de activación transcripcional, localizado en el extremo amino terminal, es el encargado de reclutar cofactores de transcripción y proteínas modificadoras como CBP o p300 y, además, interacciona con el regulador negativo MDM2. En este extremo también se localiza una región rica en residuos de prolina importante para los procesos apoptóticos mediados por p53. En la región central de la proteína se encuentra el dominio de unión al DNA a través del cual p53 se une a secuencias consenso específicas, denominadas elementos de respuesta a p53, presentes en la región promotora de sus genes diana (48). Esta unión con el DNA es imprescindible para la actividad transcripcional de p53 y, por tanto, para su actividad como supresor tumoral. El extremo carboxilo terminal contiene el dominio de regulación y el dominio de oligomerización a través del cual se forma un tetrámero simétrico que es activo como factor de transcripción (46, 47).

La proteína p53 está implicada en múltiples funciones celulares responsables del mantenimiento de la homeostasis celular (49, 50). P53 se expresa constitutivamente en la célula de manera inactiva a bajas concentraciones, pero sus niveles celulares aumentan y adquiere un estado activo en respuesta a múltiples situaciones de estrés celular como daños directos en el DNA, proliferación celular incontrolada debida a una activación oncogénica, erosión de telómeros, hipoxia o estrés oxidativo (Figura 6) (51, 52). Las respuestas inducidas por p53 son variables y dependen tanto del tipo celular como de la naturaleza del agente dañino y/o del estrés celular (51).

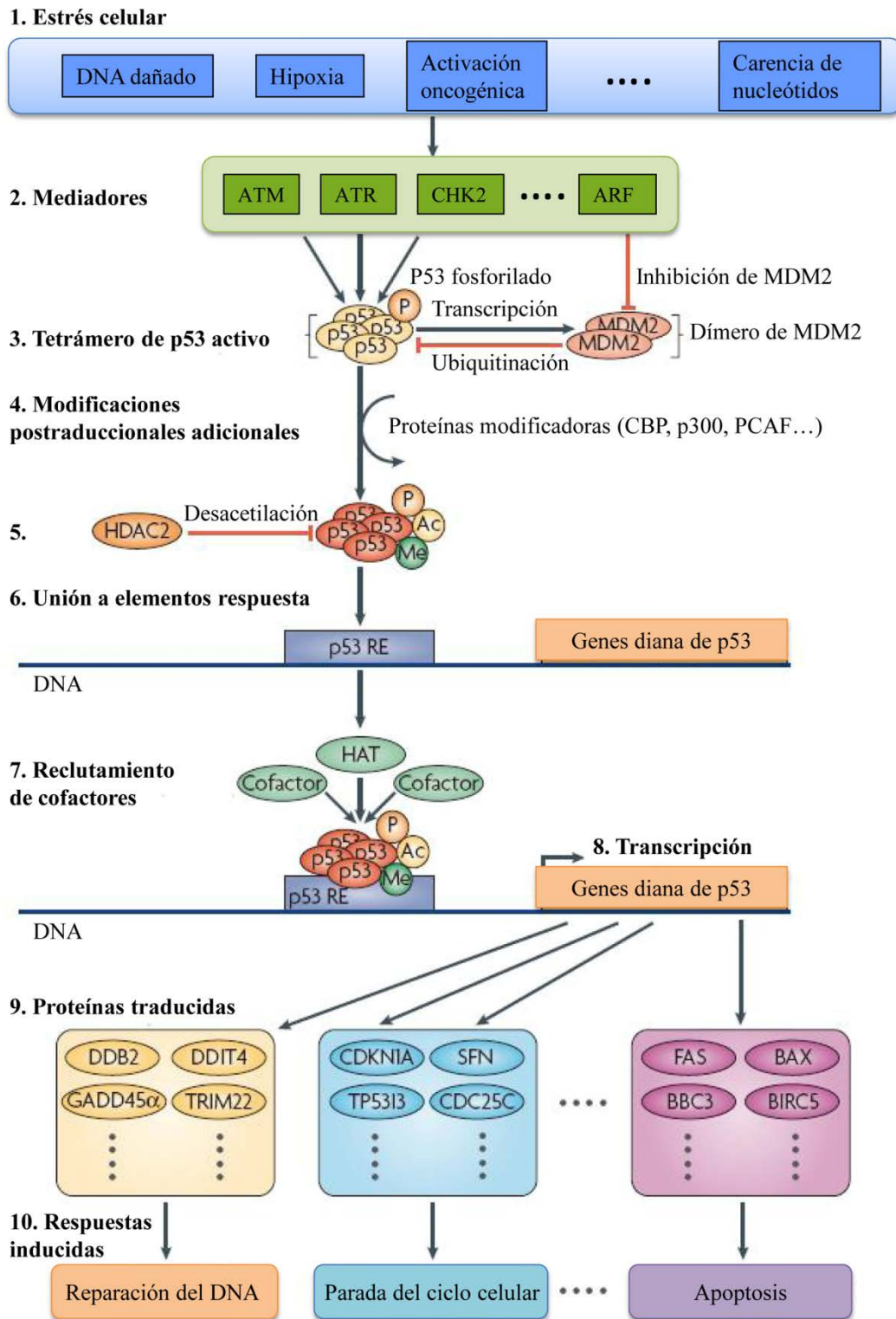


Figura 6. Mecanismos de activación de p53, mediadores y respuestas producidas por la activación de la transcripción génica.

La ubiquitina ligasa MDM2 es el regulador clave de la estabilidad y los niveles de p53, existiendo un mecanismo de control negativo de regulación entre ambas

proteínas (53, 54). En condiciones normales, MDM2 interacciona con p53 inhibiendo su actividad transcripcional y, además, MDM2 ubiquitina p53 promoviendo su exportación nuclear y marcándolo para su degradación en el proteosoma (53, 55). Sin embargo, en condiciones de estrés se producen diversas modificaciones postraduccionales en p53 como fosforilaciones o acetilaciones que generan cambios conformacionales en la proteína (54, 56). Todo ello está encaminado a interrumpir la interacción entre p53 y MDM2, y a producir la estabilización, acumulación y activación de p53 (57).

El principal mecanismo por el cual p53 ejerce su función es como factor de transcripción de genes implicados en la parada del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis (Figura 6) (57). P53 induce la parada del ciclo celular en la fase G1 en respuesta a daños en el DNA mediante la activación de p21 (58), mientras que otros genes diana de p53 como Reprimo, 14-3-3 σ o GADD45 intervienen en la parada del ciclo celular en la fase G2 (49, 59). La expresión de oncogenes como Myc o Ras también provoca una parada del ciclo celular al aumentar los niveles de p16 y ARF (60). Además, en determinadas situaciones de estrés o ante daños que no pueden ser reparados, p53 puede inducir senescencia celular, una parada irreversible del ciclo celular, a través de la activación de la expresión de PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno 1) y p21 (50).

La inducción de la apoptosis mediada por p53 tiene lugar mediante la activación de la transcripción de genes proapoptóticos como BAX, PERP, FAS, NOXA o PUMA (61). P53 también puede activar la apoptosis de manera independiente de su actividad transcripcional al traslocarse a la mitocondria e interactuar directamente con las proteínas antiapoptóticas BCL-XL y BCL-2, antagonizando su actividad (51, 62). La decisión celular entre inducir la parada de ciclo celular o sufrir un proceso de apoptosis en respuesta a una señal de estrés depende de muchos factores como el tipo celular, la eficiencia de los mecanismos de reparación del DNA, la composición oncogénica de la célula, los estímulos extracelulares o la intensidad de las condiciones de estrés (50).

La proteína p53 también es importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Participa en la reparación de daños en el DNA activando la transcripción de diversos genes como la ribonucleótido reductasa p53R2, XPC o GADD45, inhibiendo

así la síntesis de DNA y estimulando la reparación por escisión de nucleótidos (49, 63). Además, p53 está involucrado en otras funciones celulares entre las que se encuentran la inhibición de la angiogénesis, la regulación de la glucólisis y la autofagia o el control de las especies reactivas de oxígeno (52, 59).

TP53 es el gen más frecuentemente alterado en tumores humanos (49). La vía de señalización regulada por p53 está alterada en el 80% de todos los tumores, y en el 50% de los casos es debido a mutaciones en el gen (64, 65). El 95% de las mutaciones se producen en el dominio de unión al DNA y la mayor parte son mutaciones *missense* localizadas en aminoácidos clave para la función de la proteína, denominados “puntos calientes” (codones 175, 248, 273 y 282) (64, 65). En otras ocasiones, la función de p53 se ve comprometida por la desregulación de genes cuyos productos interactúan con p53 o transmiten información a/o desde p53, como MDM2, p21 o ARF (50).

En gliomas, más del 60% de los astrocitomas de bajo grado, anaplásicos y glioblastomas secundarios presentan mutaciones en *TP53*, mientras que en los glioblastomas primarios la frecuencia es menor y la inactivación de la ruta de p53 se debe a la pérdida de ARF o a la amplificación de MDM2 (25).

5.2. P63

P63 es un factor de transcripción de la familia de p53 localizado en la región cromosómica 3q28. Tiene una estructura similar a p53 con un dominio de transactivación, una región rica en residuos de prolina, un dominio de unión al DNA y un dominio de oligomerización. Además, p63 presenta un dominio de interacción (SAM, *sterile a-motif*), un dominio de activación transcripcional adicional (TA2) y un dominio de represión transcripcional (TI) en el extremo carboxilo terminal (Figura 7) (66, 67).

La proteína p63 presenta 6 isoformas. Mediante el uso alternativo de sus dos promotores se generan dos clases de isoformas, TAp63 que es la isoforma larga y completa, y la isoforma corta Δ Np63 que carece del dominio de transactivación. Además, existen otras 3 isoformas, α , β y γ , generadas por el procesamiento alternativo del mRNA que difieren en la región carboxilo terminal (Figura 7) (66).

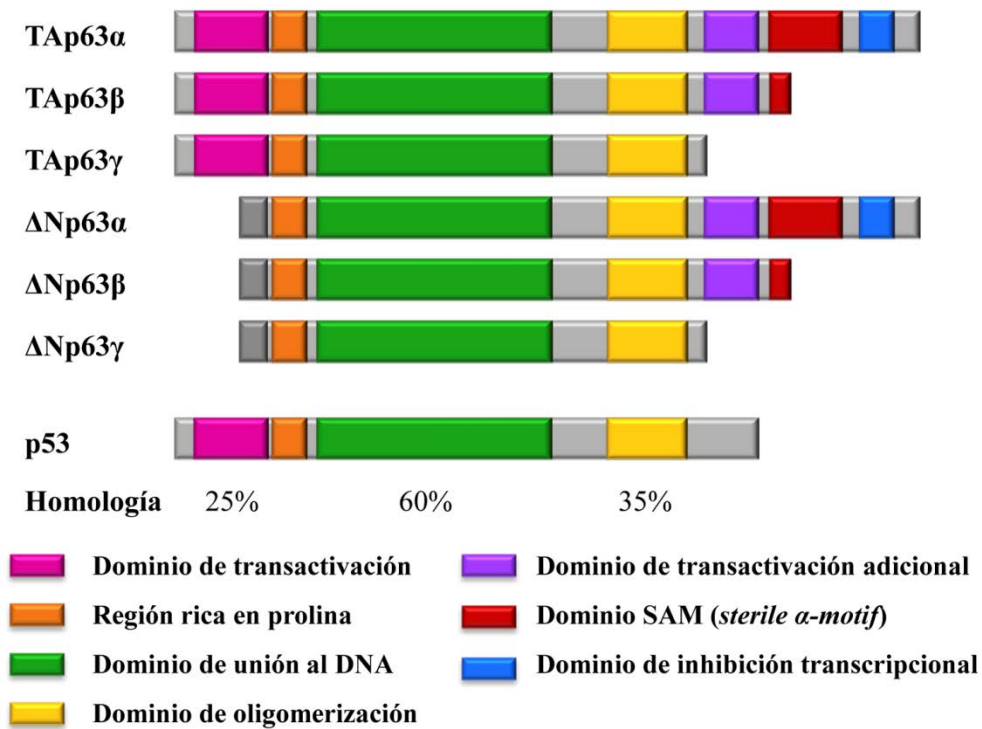


Figura 7. Estructura de las diferentes isoformas de p63 y su homología con p53.

P63 regula un elevado número de genes y juega un papel fundamental en el desarrollo epitelial, así como en la regulación del ciclo celular, la respuesta a daños en el DNA, la senescencia, la apoptosis e incluso en el desarrollo tumoral (68, 69). Las isoformas ΔN parecen tener funciones opuestas a las isoformas largas TA. Las isoformas TAp63, por su elevada homología con p53, son capaces de transactivar genes diana de p53 como p21, GADD45 o BAX induciendo la parada del ciclo celular o la apoptosis (66). Por el contrario, las formas $\Delta Np63$ promueven el crecimiento celular y protegen a las células de la apoptosis mediante la activación de genes como EGFR, JAG1 o Hsp70, y por su función dominante negativa al contrarrestar la actividad transcripcional de las isoformas TAp63 y de p53 (66, 70). De esta forma, TAp63 actuaría como un supresor tumoral mientras que $\Delta Np63$ lo haría como un oncogén (71).

Las alteraciones en la expresión de p63 están asociadas con la progresión de diversos tipos de tumores, el tamaño tumoral, la invasión local y el mantenimiento del fenotipo “*cancer stem cell*”, mientras que mutaciones en el gen son muy poco frecuentes (71, 72). La forma que se ha detectado de manera predominante es la $\Delta Np63$ que posee efectos antiapoptóticos y proliferativos, aunque el ratio entre las formas

TAp63 y Δ Np63 es el que determina el resultado biológico (71). Por el contrario, el papel de p63 en la capacidad de un tumor de metastatizar es diferente, relacionándose la expresión de p63 con una menor invasión y metástasis. Se ha observado que tumores epiteliales agresivos y metastásicos pierden la expresión de p63, lo que sugiere que la pérdida de p63 acelera la tumorigénesis y la invasión metastásica (71, 72).

5.3. VRKs

La familia de quinasas VRK (*Vaccinia-Related Kinases*) es un grupo de serina/treonina quinasas que consta en humanos de tres miembros: VRK1 y VRK2, que son catalíticamente activos y con una intensa actividad de autofosforilación, y VRK3 que es una pseudoquinasa con funciones de andamiaje (73-75). Tanto VRK1 como VRK2 presentan en su región amino terminal el dominio catalítico con un sitio de unión a ATP y un sitio serina/treonina quinasa activo. Sin embargo, difieren bastante en su región reguladora localizada en el extremo carboxilo terminal (Figura 8) (73, 74).

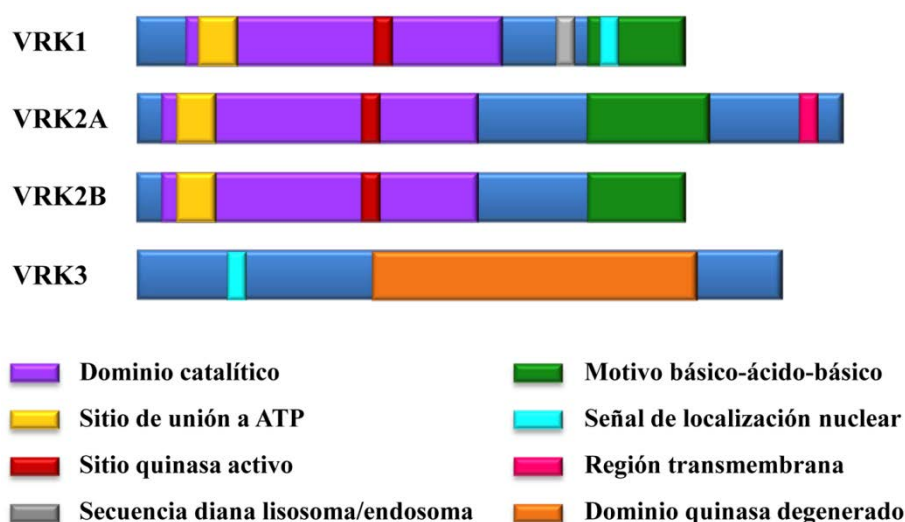


Figura 8. Representación esquemática de los dominios de las VRKs humanas.

VRK1 es el miembro mejor caracterizado de la familia de quinasas VRK. El gen *VRK1* se localiza en la región cromosómica 14q32 y codifica una proteína de 396 aminoácidos que presenta en su extremo carboxilo una señal de localización nuclear (Figura 8) (74). Sin embargo, aunque VRK1 es una proteína principalmente nuclear, su localización varía dependiendo del tipo celular y de las condiciones de crecimiento, y

se han detectado subpoblaciones tanto en el citoplasma como en el aparato de Golgi (76). Además, los niveles de expresión de VRK1 están relacionados con la tasa de proliferación celular (76, 77).

La proteína VRK1 está implicada en el control de la proliferación y progresión del ciclo celular a través de la regulación de factores de transcripción como ATF2, CREB o c-Jun, y la modulación de los niveles de p53 (54, 78). VRK1 fosforila específicamente p53 en la treonina 18, impidiendo su interacción con MDM2 y aumentando la estabilidad de p53 (74, 79). Además, existe un circuito de autorregulación entre p53 y VRK1, por el cual la acumulación de p53 fosforilado, al inducir la expresión de DRAM, provocaría la degradación de VRK1 por vía endocítica-lisosomal (80). VRK1 también participa en el control del ensamblaje de la envuelta nuclear, en la fragmentación del aparato de Golgi y en la condensación de la cromatina mediante la fosforilación de la histona H3 (78, 81).

El gen *VRK2*, localizado en la región cromosómica 2p16, codifica dos isoformas generadas por la maduración alternativa de su mRNA que difieren en su extremo carboxilo, VRK2A y VRK2B (Figura 8) (73). La isoforma VRK2A, de 508 aminoácidos, se encuentra anclada a las membranas del retículo endoplasmático, mitocondria y envuelta nuclear mediante la región transmembrana hidrofóbica que presenta en su extremo carboxilo terminal (Figura 8). Sin embargo, la isoforma VRK2B, de 397 aminoácidos, carece de esta región hidrofóbica y se detecta tanto en el citoplasma como en el núcleo (73).

La función y regulación de VRK2 es menos conocida. VRK2A interviene en la regulación de rutas mediadas por MAPK quinasas como la modulación de la respuesta celular mediada por interleucina-1 β y la respuesta a condiciones de hipoxia (82, 83). Actúa también como modulador negativo en la ruta de señalización de EGFR de forma independiente de su actividad quinasa mediante la interacción con Mek1 y la proteína de anclaje KSR1 (84). Tanto VRK2A como VRK2B fosforilan p53 *in vitro*, aunque únicamente VRK2B lleva a cabo esta función *in vivo* mediando su estabilización y acumulación (73). VRK2B podría tener una función parcialmente redundante con VRK1 y reemplazarla funcionalmente en el núcleo en aquellas células en las que VRK1

presenta una localización citosólica (73). Además, al igual que ocurría con VRK1, p53 es capaz de inducir la degradación de VRK2A y VRK2B (85).

Las alteraciones en la función quinasa de las VRKs están relacionadas con el desarrollo tumoral. Altos niveles de VRK1 están presentes en tumores con mutaciones en el gen *TP53* y se encuentran asociados a una mayor proliferación en tumores de cabeza y cuello y de pulmón (86, 87). Además, la expresión de VRK1 se ha asociado con mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (88), mientras que la expresión de VRK2 en cáncer de mama está relacionada con buen pronóstico de los pacientes al correlacionarse positivamente con los niveles de receptores de estrógeno y progesterona y negativamente con ERBB2 (84).

6. RUTA DE SEÑALIZACIÓN EGFR/PI3K/PTEN/RAS

6.1. EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa ERBB formada por cuatro miembros: EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2/NEU, ERBB3/HER3 y ERBB4/HER4 (89).

El gen *EGFR* se localiza en el cromosoma 7p12 y codifica una proteína de 170 kDa que tiene cuatro dominios funcionales: el dominio extracelular de unión a ligando que se encuentra subdividido en cuatro dominios I-IV, el dominio transmembrana, el dominio intracelular con actividad tirosina quinasa y el dominio de regulación carboxilo terminal que contiene múltiples tirosinas que se fosforilan específicamente tras la unión del ligando (90, 91).

Los principales ligandos de EGFR son EGF (*epidermal growth factor*) y TGF- α (*transforming growth factor- α*). La unión del ligando al dominio extracelular genera la dimerización del receptor estimulando la actividad tirosina quinasa intrínseca que autofosforila residuos de tirosina específicos en el dominio de regulación citoplasmático. Esta fosforilación permite la unión de diferentes moléculas de señalización que contienen dominios SH2 o PTB, responsables de la transmisión de la señal y, por tanto, de la activación de rutas de señalización implicadas en el control de procesos celulares como la proliferación, la migración, la evasión de la apoptosis o la

angiogénesis (92, 93). Las principales vías de señalización activadas por EGFR son la vía de señalización de PI3K/PTEN/AKT y la ruta de proteínas quinasa activadas por mitógeno RAS/RAF/MEK/ERK (Figura 9) (89, 94).

El gen *EGFR* se encuentra amplificado y/o mutado en un gran número de tumores (95). En los astrocitomas, las alteraciones en *EGFR* son frecuentes en los tumores de alto grado pero no en los de bajo grado (19). El 40% de los glioblastomas presenta amplificación de *EGFR* y el 20-30% expresan la variante EGFRvIII que carece de los exones 2 al 7, correspondientes a los dominios extracelulares I y II, y presenta actividad tirosina quinasa constitutiva en ausencia de ligando (37, 96). Además, la mitad de los casos con expresión de EGFRvIII presentan amplificación de *EGFR* (25, 97). La sobreexpresión de la forma truncada EGFRvIII provoca la activación constante de la ruta de PI3K confiriendo una ventaja de crecimiento e invasión a la célula tumoral (37, 98). Se han descrito también mutaciones puntuales en el dominio tirosina quinasa pero son poco frecuentes en gliomas (93, 95, 98).

6.2. PI3K

La familia de las fosfatidilinositol-3-quinosas (PI3K) está subdividida en tres clases de quinosas (I-III) en función de su estructura, localización, mecanismo de activación y el sustrato lipídico que fosforilan (99, 100). Las PI3Ks de la clase IA son las más importantes en cuanto a la regulación de la proliferación y el desarrollo tumoral (101, 102). Son heterodímeros formados por una subunidad regulatoria p85 y una subunidad catalítica p110 que son activadas por receptores tirosina quinasa (100). Existen varias isoformas de ambas subunidades, la subunidad regulatoria puede estar formada por las isoformas p85 α , p55 α , p50 α , p85 β o p55 γ , y la subunidad catalítica por las isoformas p110 α , p110 β o p110 δ (100).

La activación de PI3K provoca la fosforilación del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (99, 103). El PIP3 es un segundo mensajero de membrana capaz de unirse y activar otras proteínas con dominios PH (homólogos a plecstrina). La principal diana del PIP3 es la serina/treonina quinasa AKT que desencadena una cascada de señalización que regula múltiples

procesos celulares entre los que se encuentran principalmente el metabolismo, la proliferación y la supervivencia celular al bloquear la apoptosis (Figura 9) (102, 103).

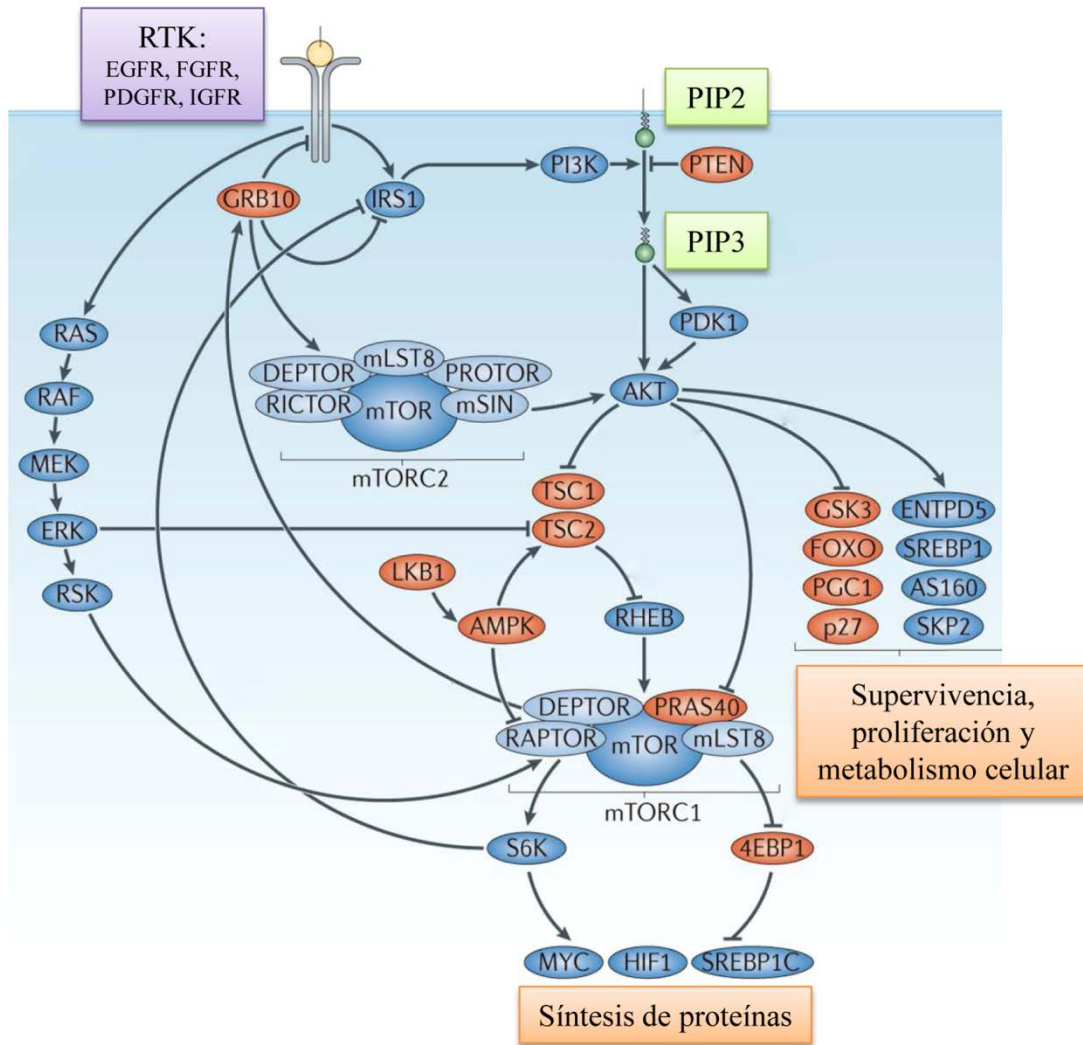


Figura 9. Ruta de señalización mediada por EGFR/PI3K/PTEN/RAS. Las proteínas que activan y reprimen la señalización de la ruta se encuentran en color azul y rojo respectivamente (RTK: receptor tirosina quinasa).

Una de las funciones más conservadas de AKT es la activación del complejo mTORC1 mediante la inhibición de las proteínas TSC1/TSC2 y PRAS40. El complejo mTORC1 activa la síntesis de lípidos y proteínas estimulando el crecimiento, la proliferación y el metabolismo celular (104). AKT estimula también la proliferación y el metabolismo celular mediante la inhibición de GSK3, p27 o p21, o la activación de AS160 o SREP1 (102, 105), e incrementa la supervivencia celular al regular negativamente proteínas como FOXO, BCL2 o BAD, o mediante la activación de

MDM2 que regula negativamente la función de p53 (102, 105). Además, AKT juega un papel importante en la angiogénesis mediante la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y el aumento de la producción de HIF-1 α por la activación del complejo mTORC1 (106).

Existen otros efectores distintos de AKT sobre los que puede actuar PI3K entre los que se incluye la familia Rho de GTPasas (Rho, RAC1 y Cdc42) que interviene en procesos como la polaridad, la motilidad o la diseminación celular (107).

La ruta de señalización de PI3K se encuentra alterada por diversos mecanismos en muchos tumores, y con frecuencia es debido a amplificaciones y mutaciones en el gen *PI3KCA* que es considerado un oncogén (102, 108). En gliomas de alto grado se han observado mutaciones en el gen *PI3KCA* en el 5-7% de los casos (109).

El gen *PI3KCA* se localiza en el locus 3q26, está formado por 20 exones y codifica la subunidad catalítica p110 α . Esta subunidad está compuesta por cinco dominios funcionales: un dominio adaptador de unión a la subunidad de regulación p85 α que mantiene los niveles de PI3K bajos en células quiescentes, un dominio de unión a Ras, un dominio C2 por el que establece uniones con otras proteínas y lípidos, entre ellos los lípidos de membrana, un dominio helicasa que sirve de puente entre el dominio C2 y quinasa, y un dominio catalítico quinasa (110). Más del 75% de las mutaciones descritas en *PI3KCA* se localizan en los dominios helicasa (exón 9) y quinasa (exón 20), donde se encuentran residuos muy conservados evolutivamente (102, 108).

6.3. PTEN

El gen supresor tumoral *PTEN* se encuentra en el locus 10q23 y está formado por 9 exones (111, 112). Codifica una proteína de 403 aminoácidos que consta de un dominio catalítico fosfatasa y un dominio de unión a PIP2 en el extremo amino terminal, un dominio C2 mediante el que establece uniones con lípidos de membrana y otras proteínas, una cola con secuencias PEST (Pro, Glu, Ser, Thr) implicadas en la estabilidad y degradación de la proteína, y un dominio PDZ de interacción con otras proteínas en el extremo carboxilo terminal (113). Tiene una vida media larga y se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos, estando estrechamente regulado por

mecanismos transcripcionales, postranscripcionales y postraduccionales, y a través de interacciones proteína-proteína (113, 114).

PTEN es una fosfatasa dual que actúa sobre proteínas y lípidos cuya función principal es desfosforilar el PIP3 a PIP2 en la membrana plasmática antagonizando la vía de señalización de PI3K (Figura 9). Así, PTEN participa en la regulación de múltiples procesos celulares entre los que se incluyen la regulación del ciclo celular, la supervivencia celular, la adhesión y motilidad celular, la angiogénesis, la homeostasis de la glucosa o el control del crecimiento y tamaño celular (113, 115).

PTEN también puede actuar como fosfatasa sobre diferentes proteínas participando en la regulación de otras vías de señalización distintas a la de PI3K. Interviene en la regulación de interacciones dinámicas de la superficie celular e inhibe procesos de migración e invasión celular al actuar sobre proteínas como FAK, Rac1 o Cdc42, inhibe la vía de señalización de proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK) al desfosforilar Shc, RAS o IRS-1 (116), y también participa en la regulación de la vía de JNK (*Jun N-terminal Kinase*) de manera independiente de AKT (117).

Aunque PTEN se localiza principalmente en el citoplasma, puede traslocarse al núcleo donde ejerce funciones importantes independientes de su actividad fosfatasa que parecen estar mediadas, al menos en parte, por el dominio carboxilo terminal (113, 116). En el núcleo, PTEN ejerce un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica al unirse al centrómero de los cromosomas a través de la proteína centromérica C (CENP-C), y mediante la activación de la proteína RAD51 promoviendo la reparación de roturas de DNA de doble cadena (118). Además, PTEN interacciona con p300/CBP promoviendo la acetilación de p53 en respuesta a daños en el DNA (119), y regula la transcripción de genes importantes entre los que se encuentran la *ciclina D1*, *c-Met*, *NF- κ B*, *CREBP*, *AP-1*, *MDM2* o *IGF-2* implicados en procesos celulares críticos como el control del ciclo celular o la reparación del DNA (113, 114).

La pérdida de PTEN conlleva el aumento de los niveles de PIP3 estimulando el crecimiento y la supervivencia celular (113). Sin embargo, la pérdida completa de la función de PTEN en fases tempranas del desarrollo tumoral está asociado con un

crecimiento lento, elevados niveles de p53 y senescencia celular hasta que se produce la pérdida concomitante de p53 (120).

La pérdida de función de PTEN puede producirse tanto por mutaciones en el gen, deleciones del locus 10q23 e hipermetilación del promotor de *PTEN*, siendo uno de los genes más alterado en tumores humanos (113). La deleción hemigota de *PTEN* es frecuente en los astrocitomas de alto grado, principalmente en los glioblastomas, y está relacionada con la progresión tumoral y las fases avanzadas de la enfermedad (114). Además, las mutaciones en el gen se producen en el 35% de los casos y generan una activación de AKT similar a las mutaciones oncogénicas en PI3K (35, 100).

6.4. BRAF

El oncogén BRAF pertenece a la familia de las serina/treonina quinasas RAF formada por tres miembros, ARAF, BRAF y CRAF. BRAF es una proteína efectora de RAS y participa en la transducción de la señal desde la superficie celular hasta el núcleo en la vía de señalización de RAS/RAF/MEK/ERK, controlando procesos como la proliferación celular, la diferenciación o la apoptosis (Figura 9) (121, 122).

El gen *BRAF*, localizado en el cromosoma 7q34, está compuesto por 18 exones y codifica una proteína formada por tres regiones altamente conservadas: CR1 y CR2 localizadas en el extremo amino terminal donde se encuentra el dominio de regulación, y CR3 en el extremo carboxilo terminal que comprende el dominio quinasa (Figura 10A) (122, 123). CR1 y CR2 contienen el sitio de unión a RAS, una región rica en cisteínas y otra en residuos de serina y treonina importantes para la interacción con el dominio quinasa y la inhibición de su actividad catalítica en células quiescentes (122, 123).

Las mutaciones puntuales en el gen *BRAF* ocurren en el 8% de los tumores, siendo muy frecuentes en el melanoma, cáncer de tiroides, de colon y de ovario (122, 124). Estas mutaciones se agrupan en dos regiones del dominio quinasa, en el exón 11 en la región rica en residuos de glicina y en el exón 15 en el segmento de activación, y generan una proteína que induce una activación constante de ERK (123, 124). La sustitución Val600Glu en el exón 15 representa el 90% de las mutaciones puntuales de

BRAF (124), y ha sido descrita en el 25% de los astrocitomas pediátricos de grados II a IV (125, 126).

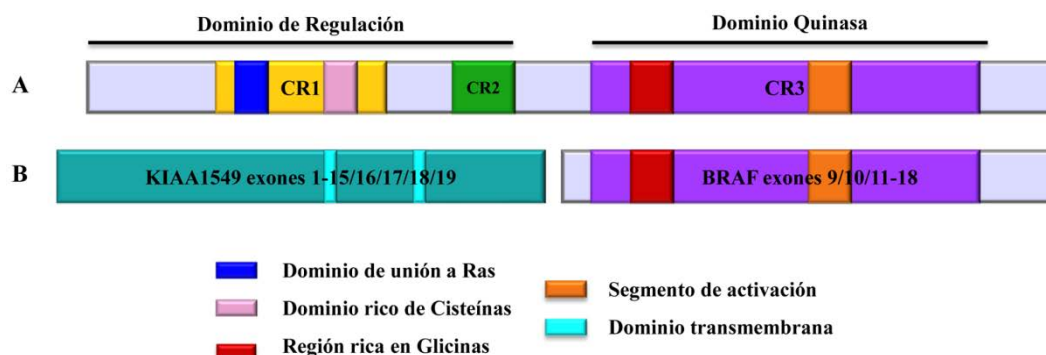


Figura 10. A) Estructura de los dominios de la proteína BRAF. B) Representación del reordenamiento entre los genes *KIAA1549* y *BRAF*.

Se han descrito también diferentes reordenamientos en los genes *BRAF* y *RAF1* que generan proteínas con actividad quinasa constitutiva en tumores de próstata, gástricos, melanoma y astrocitomas pilocíticos (31, 127). En el 60-70% de los astrocitomas pilocíticos se ha descrito una duplicación en tándem de aproximadamente 2.5Mb localizada en 7q34, poco frecuente en gliomas de mayores grados de malignidad (31, 128, 129). Los puntos de corte de este reordenamiento se encuentran en los genes *KIAA1549* y *BRAF* generando una proteína de fusión que incorpora el dominio quinasa del oncogén *BRAF* (Figura 10B) (31). Se han descrito 7 puntos de corte diferentes siendo los más frecuentes *KIAA1549* exón 16-*BRAF* exón 9, *KIAA1549* exón 15-*BRAF* exón 9 y *KIAA1549* exón 16-*BRAF* exón 11, pero todos ellos presentan en fase el dominio quinasa de BRAF y una fuerte actividad quinasa constitutiva (31, 128, 129). Aunque la activación de BRAF es constitutiva, se ha observado que puede llegar a inducir senescencia en tumores benignos de lento crecimiento (130, 131).

7. IDH1 E IDH2

Las enzimas isocitrato deshidrogenasa (IDH1, IDH2 e IDH3) catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato a α -cetoglutarato produciendo NADPH. La enzima IDH1 se localiza en el citosol mientras que IDH2 e IDH3 se encuentran en la mitocondria formando parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs (Figura 11) (132, 133). IDH1 e IDH2 funcionan como homodímeros y se piensa que

juegan un papel importante en el control celular del daño oxidativo mediante la producción de NADPH (134).

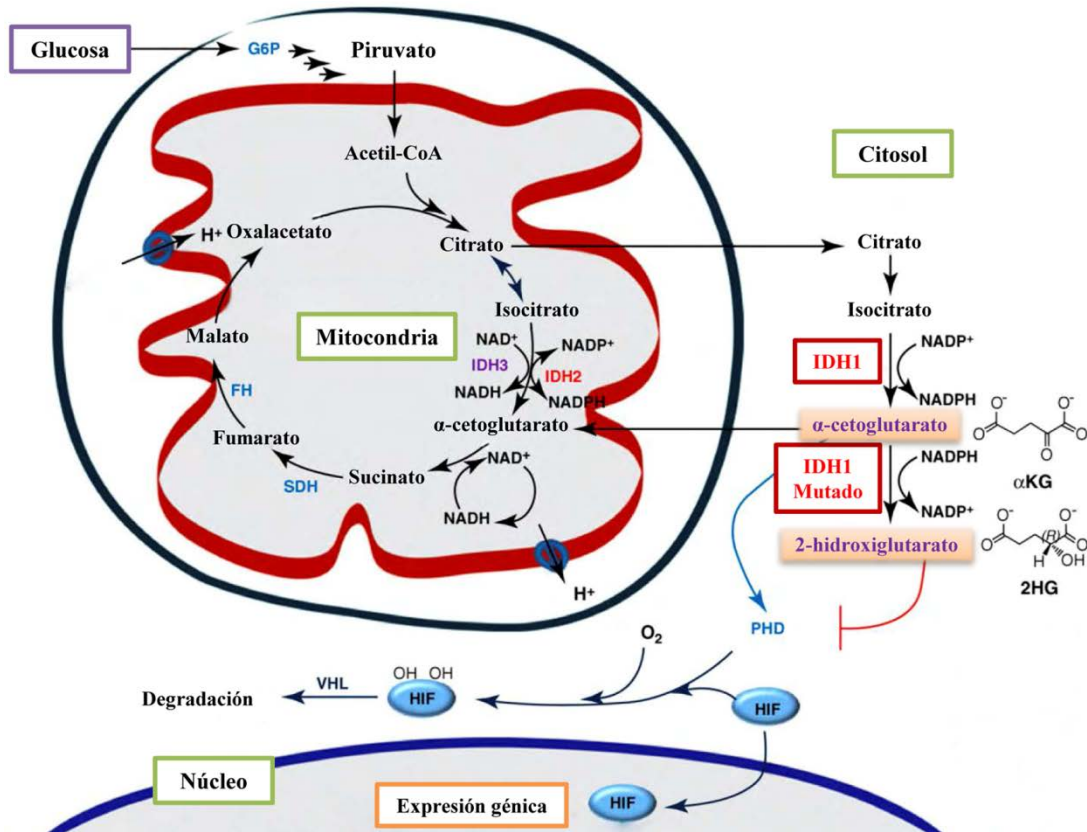


Figura 11. Papel de IDH1 en el metabolismo de los glomas. Representación esquemática del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la producción de 2-hidroxiglutarato por la proteína IDH1 mutada.

Se han descrito mutaciones *missense* en heterocigosis en los genes *IDH1* e *IDH2* que afectan mayoritariamente a la arginina del codón 132 de *IDH1* y 172 de *IDH2* (27, 32). Ambos codones son residuos conservados a lo largo de la evolución, localizados en posiciones análogas de las isozimas en el sitio activo de unión a sustrato, y necesarios tanto para la unión a sustrato como para la catálisis de la reacción (135, 136). Se piensa que la proteína mutada inhibe de manera dominante negativa la actividad del alelo germinal al formar con él heterodímeros catalíticamente inactivos (137, 138).

Las mutaciones en *IDH1* son muy frecuentes en gliomas y leucemia mieloide aguda, mientras que en otros tumores es raro encontrar alteraciones en este gen (139, 140). Más del 75% de los gliomas de bajo grado, anaplásicos y glioblastomas

secundarios presentan mutaciones en *IDH1*; sin embargo, en glioblastomas primarios y astrocitomas pilocíticos la frecuencia es menor del 10% (16, 27). También se han identificado mutaciones en *IDH2* en un 3% de los gliomas, asociadas principalmente con el desarrollo de oligodendrogliomas y, en general, no tienen lugar a la vez que las mutaciones en *IDH1* (141, 142). Las mutaciones en estos genes se cree que son importantes en el desarrollo del tumor, aparecen en pacientes jóvenes y están asociadas con un mejor pronóstico independientemente del grado tumoral (27, 32).

Las mutaciones en *IDH1* disminuyen la producción de α -cetoglutarato y NADPH afectando a diversas rutas bioquímicas como la síntesis lipídica, la síntesis de colesterol o la formación de antioxidantes como el glutatión (143). Además, la proteína *IDH1* mutada cataliza la formación de 2-hidroxiglutarato desde el α -cetoglutarato con la consiguiente oxidación de NADPH (Figura 11). Altas concentraciones de 2-hidroxiglutarato promueven el crecimiento tumoral y la angiogénesis, y se han asociado con el desarrollo de tumores cerebrales (136, 138). Al disminuir los niveles de α -cetoglutarato y aumentar la concentración de 2-hidroxiglutarato se aumentan los niveles del factor HIF-1 α , ya que el 2-hidroxiglutarato puede inhibir competitivamente distintas enzimas dependientes de α -cetoglutarato como la dioxigenasa proil-hidroxilasa (PHD) que regula los niveles del factor HIF-1 α al facilitar su degradación por el proteosoma (Figura 11) (134, 137). Estudios recientes indican que el 2-hidroxiglutarato también inhibe proteínas que catalizan la desmetilación de las histonas y del DNA bloqueando de manera epigenética la diferenciación específica de linaje de células progenitoras neurales a células maduras y favoreciendo así el desarrollo tumoral (144, 145).

8. REPARACIÓN DEL DNA

Las células se encuentran constantemente expuestas a multitud de agresiones tanto ambientales como endógenas que pueden producir daños en el DNA. Por ello, las células han desarrollado diversos mecanismos de reparación del DNA que evitan la acumulación de mutaciones y facilitan el mantenimiento de la integridad genómica. Las cuatro vías fundamentales de reparación del daño son: la reparación por escisión de

nucleótidos, la reparación por escisión de bases, la reparación de roturas de doble cadena y la reparación de emparejamientos erróneos (146).

Las deficiencias en los mecanismos de reparación están implicadas en el desarrollo de tumores tanto esporádicos como familiares así como en la sensibilidad al tratamiento con agentes quimioterápicos (147). Se han descrito diversos polimorfismos en genes reparadores como *ERCC1*, *ERCC2*, *PRKDC*, *RAD51* o *ERCC7* que confieren una mayor susceptibilidad al desarrollo de varios tipos de tumores entre los que se encuentran los gliomas (8, 9, 16).

8.1. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS

El mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER, *Nucleotide Excision Repair*) elimina los daños generados por hidrocarburos aromáticos policíclicos y la radiación ultravioleta como los dímeros de pirimidinas, los fotoproductos 6-4 o las uniones intracadena, que generan lesiones voluminosas que distorsionan la doble hélice del DNA.

Existen dos mecanismos de reparación NER, uno general denominado GG-NER (*global genome NER*) que reconoce y repara lesiones en cualquier punto del genoma (148), y otro acoplado a la transcripción, TC-NER (*transcription-coupled NER*), que reconoce daños que bloquean la actividad de la RNA polimerasa II en sitios transcripcionalmente activos (149). Ambos mecanismos difieren únicamente en el reconocimiento de la lesión. En GG-NER, el reconocimiento del daño es mediado por los complejos de reparación XPC-HR23B y DDB de manera independiente de la RNA polimerasa II, mientras que en TC-NER, la RNA polimerasa II recluta las proteínas CSA, CSB (*ERCC6*) y XAB2 ante una lesión durante la transcripción (Figura 12).

El reconocimiento del daño por ambos mecanismos permite la unión del factor de transcripción TFIIF, que facilita la apertura local de la doble hélice en el punto de la lesión a través de sus subunidades con actividad helicasa XPB y XPD (*ERCC2*). Los complejos XPA y RPA se unen estabilizando la estructura abierta y las endonucleasas XPG y *ERCC1-XPF* cortan a ambos lados de la zona dañada eliminando un fragmento de cadena sencilla de 27-30 nucleótidos. El hueco generado es rellenado por un complejo de DNA polimerasas (δ , κ , ϵ) y proteínas accesorias (RFC, RPA, PCNA) que

toman como molde la hebra no dañada. Finalmente, la DNA ligasa 1 o el complejo XRCC1-DNA ligasa 3 α sellan la mella en el esqueleto de DNA (Figura 12) (150, 151).

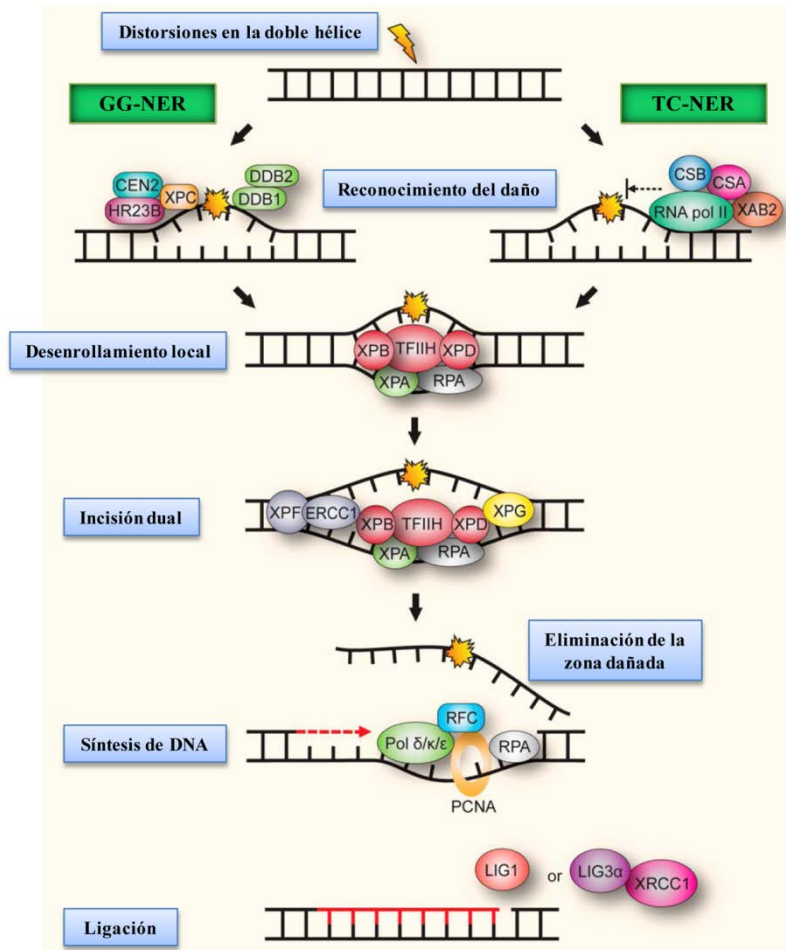


Figura 12. Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos.

8.2. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES

El mecanismo de reparación por escisión de bases (BER, *base excision repair*) se encarga principalmente de reparar los daños generados por especies reactivas de oxígeno así como los producidos por desaminaciones espontáneas o agentes alquilantes mediante la eliminación de la base modificada.

El reconocimiento y la escisión de la base alterada se lleva a cabo por una DNA glucosilasa que cataliza la hidrólisis del enlace N-glucosídico generando un sitio abásico (AP,apurínico ó apirimidínico). Existen dos tipos de DNA glucosilasas que actúan en función del tipo de daño: monofuncionales y bifuncionales, que poseen además actividad 3' AP liasa intrínseca (152). Tras la escisión de la base, las

glucosilasas bifuncionales cortan y eliminan directamente la cadena de azúcar fosfato del sitio abásico, mientras que cuando actúan las glucosilasas monofuncionales, es la AP endonucleasa APE1 la que escinde la cadena. Después, con la ayuda de la DNA polimerasa β y de APE1, se procesan los extremos del corte para generar los extremos 3'-OH y 5'-fosfato necesarios para la síntesis de DNA en el hueco (Figura 13) (153).

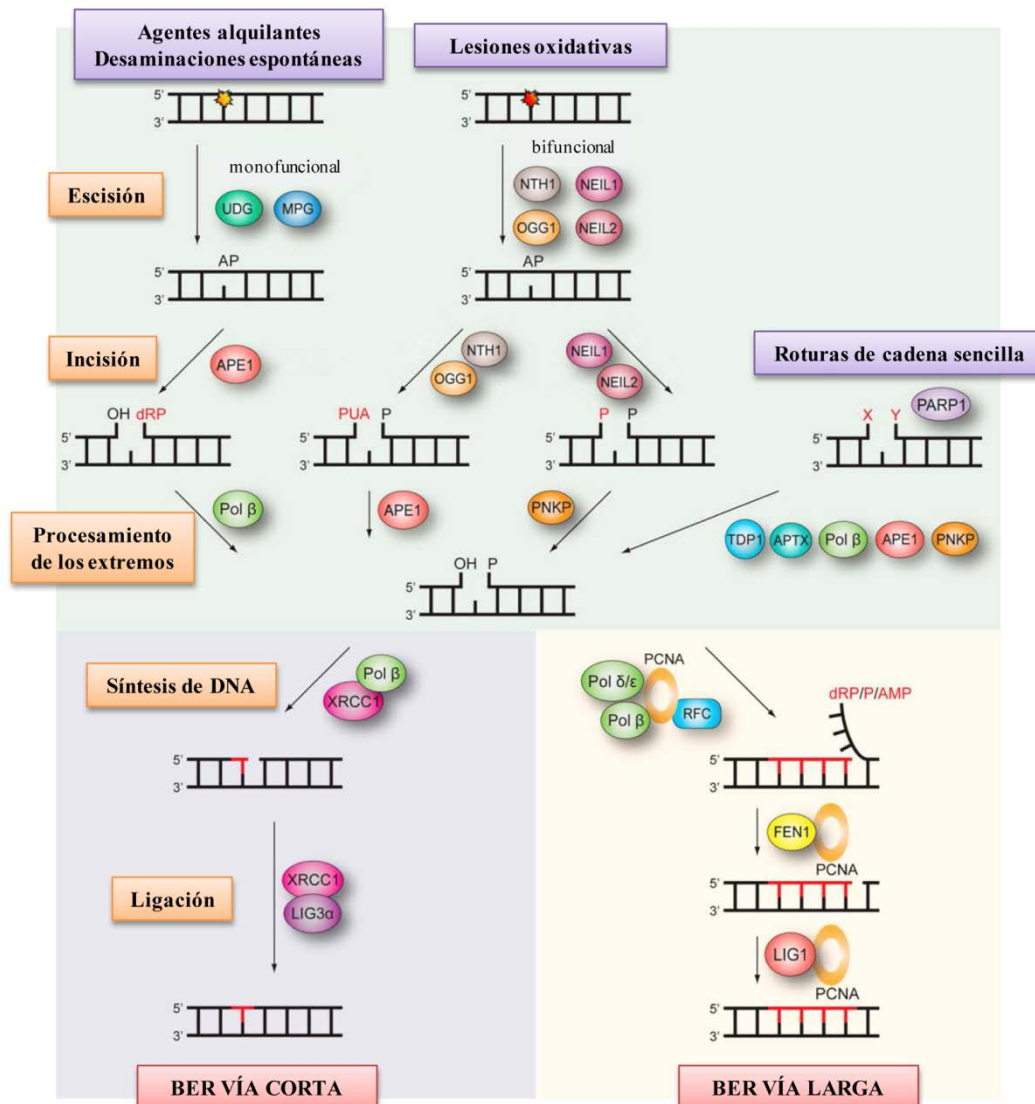


Figura 13. Mecanismo de reparación por escisión de bases.

Existe una vía corta (SP-BER, *short-patch BER*) y una vía larga (LP-BER, *long-patch BER*) de reparación del hueco (Figura 13). En la mayor parte de los casos, la DNA polimerasa β a través de la vía corta rellena el hueco en la cadena mediante la interacción con la proteína estabilizadora XRCC1 y la acción de la ligasa 3 α . La vía

alternativa larga de reparación se produce cuando el residuo terminal generado es complejo para ser procesado únicamente por la DNA polimerasa β (154, 155).

El mecanismo de reparación BER también está implicado en la reparación de las roturas de DNA de cadena sencilla (SSBR, *single-strand break repair*). Estas roturas se suelen generar por daños oxidativos o radiaciones ionizantes, y son detectadas principalmente por la proteína PARP1 que se une a la cadena rota y recluta la DNA polimerasa β y el complejo XRCC1- ligasa 3 α al lugar del daño (154, 155).

8.3. REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA

Las roturas de doble cadena son una de las lesiones más tóxicas y mutagénicas ya que pueden generar una alta inestabilidad genética debido a la pérdida o amplificación de material cromosómico o a la formación de traslocaciones cromosómicas. Estas lesiones se generan principalmente por radiaciones ionizantes, aunque compuestos genotóxicos, especies reactivas de oxígeno generadas en el metabolismo celular o errores en los procesos de replicación, reparación de daños o en la recombinación meiótica pueden también producir este tipo de daño.

Cuando se produce una rotura de doble cadena se activa principalmente la quinasa ATM, que induce la parada del ciclo celular y la formación de una serie de complejos que intervienen en la reparación del DNA. ATM recluta el complejo MRE11–RAD50–NBS1 que se une a los extremos de la rotura y los procesa y, además, ATM fosforila la histona H2AFX permitiendo la unión de otras proteínas mediadoras como TP53BP1 o MDC1 y la restructuración de la cromatina (Figura 14) (156).

Existen dos mecanismos de reparación de roturas de doble cadena (DSBR, *double-strand break repair*): la recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*) y la recombinación no homóloga (NHEJ, *non-homologous end-joining*). El tipo de mecanismo que actuará dependerá de la fase del ciclo celular, del tipo de daño que origine la rotura o de los niveles celulares de los componentes de cada ruta, aunque ambas vías pueden cooperar y funcionar simultáneamente (157).

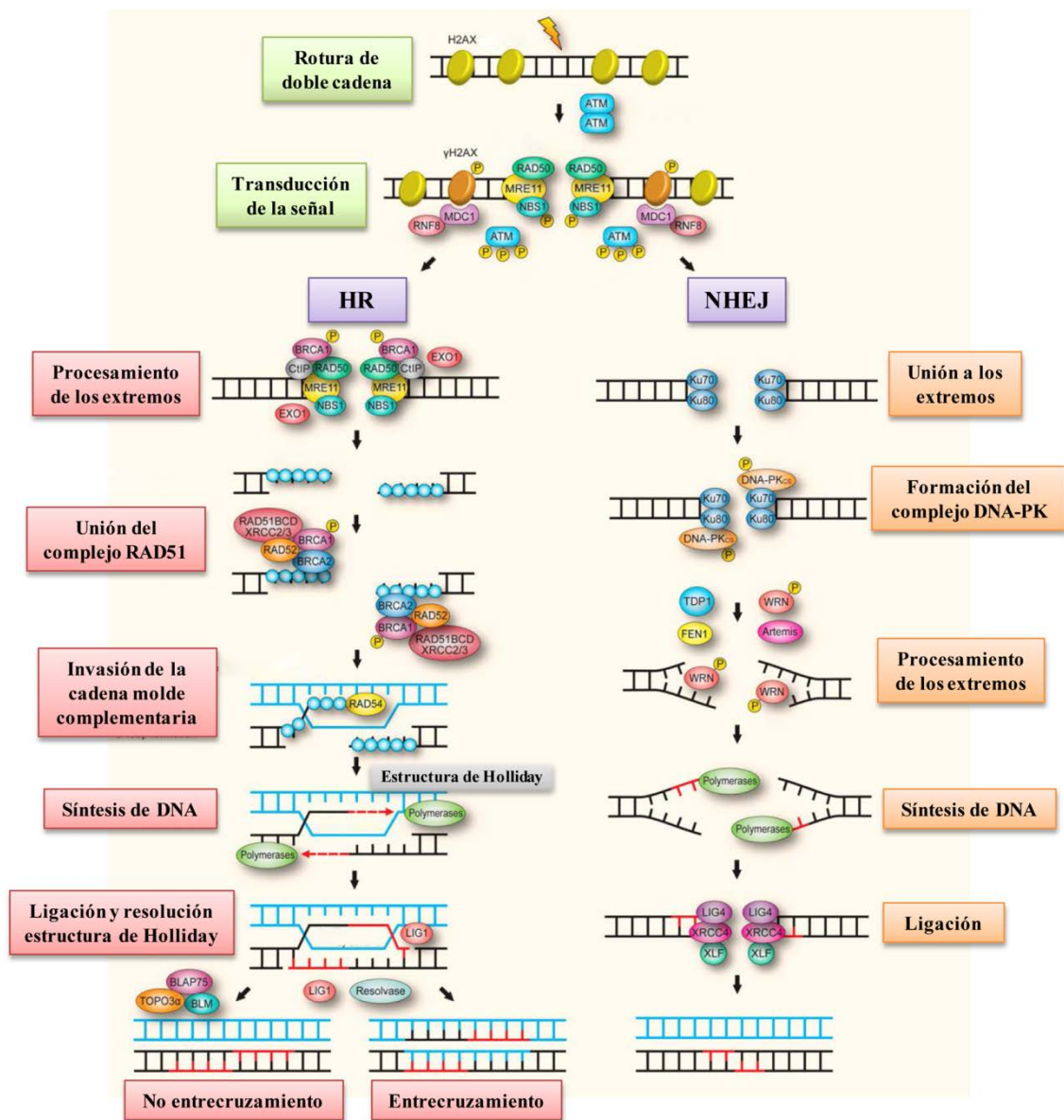


Figura 14. Mecanismo de reparación de roturas de doble cadena.

La recombinación homóloga utiliza la cromátida hermana como molde, siendo el mecanismo más preciso para reparar las roturas de doble cadena, pero únicamente tiene lugar en las fases S y G2 del ciclo celular que es cuando la cromátida hermana está accesible (157). Además, la recombinación homóloga es esencial para preservar las horquillas de replicación, el mantenimiento de los telómeros o la segregación cromosómica en la meiosis I. En la recombinación homóloga, los extremos de la rotura son procesados inicialmente por el complejo MRE11–RAD50–NBS1 y la exonucleasa EXO1, generando una cadena sencilla de DNA que es rodeada por las proteínas RAD51B/C/D, XRCC2/3, RAD52, BRCA1 y BRCA2. RAD51 promueve la invasión

de la cadena molde complementaria generando un entrecruzamiento denominado intermediario de Holliday. A medida que el DNA se va sintetizando, la ramificación de las cadenas va migrando originando una región de DNA heterodúplex formado por DNA de doble cadena de distinta procedencia. Por último, el complejo BLAP75/BLM/TopoisomerasaIII α o la Resolvasa A resuelven el heterodúplex generando productos con o sin entrecruzamiento (Figura 14) (158, 159).

Por el contrario, la recombinación no homóloga no requiere homologías en los extremos terminales del DNA, liga los dos extremos de una rotura de doble cadena sin la necesidad de un DNA molde y actúa durante todas las fases del ciclo celular (157). El heterodímero Ku70/80 se une a los extremos de la rotura reclutando la subunidad catalítica de proteína quinasa dependiente de DNA, DNA-PKcs. Se forma un complejo que activa otras proteínas como RPA, WRN, Artemis y polimerasas capaces de eliminar y/o rellenar ambos extremos de la cadena haciéndolos compatibles. Finalmente, el complejo DNA ligasa IV con XRCC4-XLF sellan la rotura (Figura 14) (156, 160).

8.4. REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS

La principal función del sistema de reparación de emparejamientos erróneos (MMR, *mismatch repair*) es el mantenimiento de la integridad genética mediante la corrección de los emparejamientos erróneos y los bucles provocados por pequeñas inserciones o deleciones generadas durante el proceso de replicación del DNA. El sistema MMR también participa en la reparación de daños provocados por agentes genotóxicos alquilantes, y en la parada del ciclo celular y/o apoptosis en respuesta a ciertos tipos de daño (161-163).

El sistema MMR se encuentra altamente conservado en la evolución y presenta grandes similitudes con el sistema MMR procariota (164). Los complejos MutS α y MutS β , formados por los heterodímeros MSH2-MSH6 y MSH2-MSH3 respectivamente, se encargan de reconocer la alteración en la secuencia del DNA e iniciar el proceso de reparación (164). MutS α reconoce principalmente los errores de emparejamiento de bases y los bucles producidos por pequeñas inserciones/deleciones

de uno o dos nucleótidos, mientras que MutS β reconoce inserciones/delecciones de mayor tamaño (162).

El complejo MutS α es el más abundante y activo en humanos. Está formado por dos subunidades muy similares entre sí, MSH2 y MSH6, que constan de cinco dominios funcionales cada una: dominio de unión al DNA, dominio conector, “*lever domain*”, “*clamp domain*” y el dominio ATPasa (165). El dominio de unión al DNA de MSH2 se une de manera inespecífica con la hebra en las proximidades de la lesión, y la especificidad de la unión del complejo MutS α al error en la molécula de DNA la proporciona la segunda proteína del heterodímero (166). En el extremo carboxilo terminal de MSH2 y MSH6 se localiza el dominio de unión e hidrólisis de ATP que es el dominio más conservado y crucial en la función del complejo MutS α . Este dominio modula la conformación de la proteína según su unión a ADP o ATP, y es a través del cual interaccionan las subunidades MSH2 y MSH6 (166, 167).

En procariotas, las zonas GATC hemimetiladas transitoriamente sirven como señal para distinguir la hebra recién sintetizada; sin embargo, en eucariotas no está claro el mecanismo y se cree que las discontinuidades asociadas a la replicación de la nueva hebra podrían servir como marcador (162, 167). Una vez reconocida la hebra hija, se produce la unión de MutS α o MutS β en la zona del desapareamiento y se recluta el complejo MutL que permite el reclutamiento adicional de proteínas implicadas en la escisión y reparación de la hebra dañada (Figura 15) (161).

Se han identificado tres heterodímeros MutL en humanos (MutL α , MutL β y MutL γ), siendo MutL α el principal en el proceso de reparación MMR (164). El complejo MutL α está formado por MLH1 y PMS2, y actúa en presencia tanto de MutS α como de MutS β . La proteína MLH1 es esencial para el proceso de reparación; consta de un dominio amino terminal muy conservado con actividad ATPasa, un dominio de unión central y en la zona carboxilo terminal se localiza el dominio de interacción con PMS2, MLH3 y PMS1, y un dominio de activación (167). En el proceso de reconocimiento también interviene la proteína PCNA que interacciona tanto con MutS α y MutS β como con MLH1, y ayuda a localizar los errores de emparejamiento en la cadena de DNA que se está replicando (163).

Las discontinuidades en la nueva hebra que se está sintetizando pueden estar localizadas a ambos lados del error, por lo que la reparación es bidireccional, se puede dar tanto en sentido 5'-3' como en sentido 3'-5' (168). La exonucleasa EXO1 interacciona con MSH2 y MLH1 y va eliminando la zona que contiene el desapareamiento, mientras la proteína RPA se une al DNA monocatenario protegiéndolo (161, 162). EXO1 está implicada en la reparación tanto 5'-3' como 3'-5', pero la escisión 3'-5' requiere también la actividad de la endonucleasa MutL α y la participación de la proteína PCNA (162, 168). Finalmente, la polimerasa Pol δ junto con PCNA se encarga de la reparación del fragmento escindido y la DNA ligasa I une el extremo a la hebra de DNA (Figura 15) (162, 163).

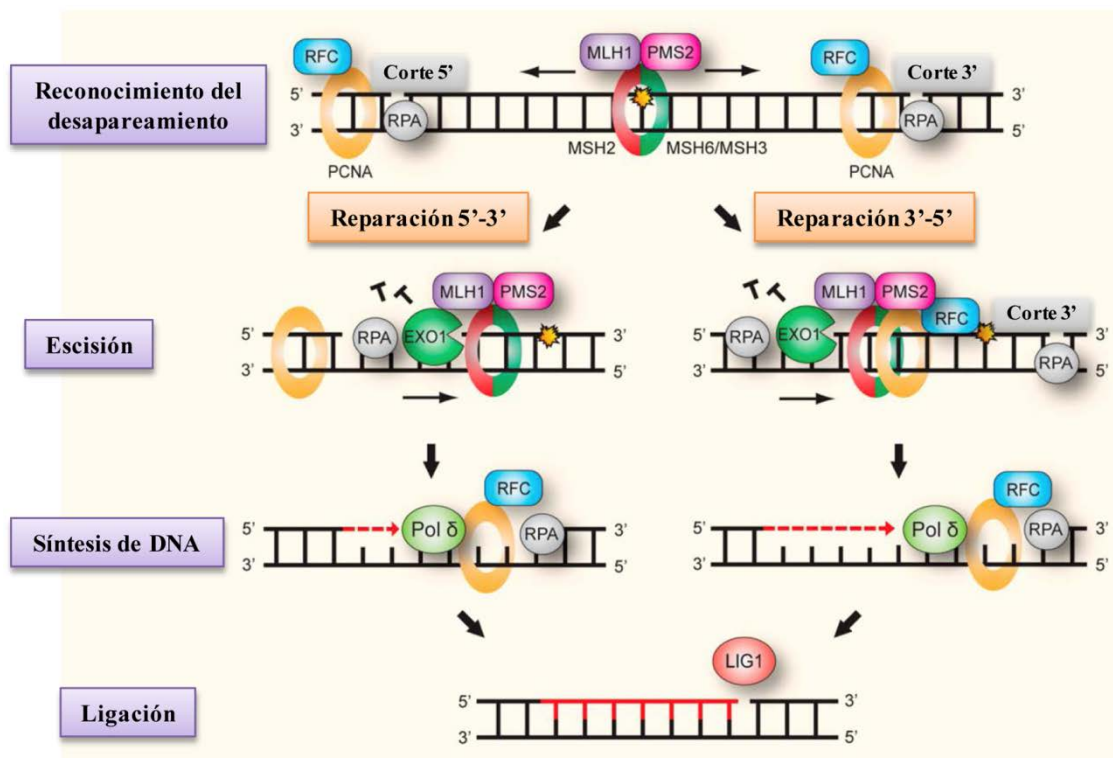


Figura 15. Mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos.

El sistema de reparación MMR mantiene la integridad y la estabilidad genética mediante la reparación de los errores replicativos. Por ello, las alteraciones en la función del sistema MMR incrementan la tasa de mutaciones espontáneas y están implicadas en el desarrollo de tumores tanto esporádicos como relacionados con el síndrome de Lynch (169).

El síndrome de Lynch es el síndrome de cáncer colorrectal más frecuente representando el 2-4% de todos los casos de cáncer de colon (170, 171). Se caracteriza por la predisposición al desarrollo a edades tempranas de tumores de colon de localización proximal así como tumores extracolónicos de endometrio, ovario, gástricos, urinarios, hepatobiliares o cerebrales (171-173). Los tumores cerebrales son poco frecuentes en los pacientes con síndrome de Lynch y suelen ser glioblastomas o astrocitomas (171).

El síndrome de Lynch es una enfermedad hereditaria autosómica dominante con una penetrancia del 80% causada por mutaciones germinales en al menos uno de los genes MMR (173). El 75-80% de las mutaciones descritas se producen en los genes MLH1 y MSH2, mientras que las mutaciones en los genes MSH6, MSH3 y PMS2 son menos frecuentes (174, 175). Estos genes se comportan como supresores tumorales ya que para que se produzca el desarrollo tumoral es necesaria la inactivación somática del otro alelo (174).

La pérdida de función del sistema MMR genera un fenotipo mutador caracterizado por un aumento de la frecuencia de mutaciones, sobre todo en regiones repetitivas conocidas como microsatélites. Los microsatélites son repeticiones de 1 a 6 nucleótidos localizados principalmente en regiones no codificantes y distribuidos a lo largo el genoma. Estas regiones son susceptibles de errores replicativos generando inestabilidad de microsatélites (MSI) cuando las modificaciones en la longitud o el número de repeticiones no son reparadas por el sistema MMR. La MSI es característica de los tumores son síndrome de Lynch (más del 80% de los casos), aunque también aparece con menor frecuencia (10-17%) en tumores esporádicos con alteraciones en el sistema MMR (170, 176).

En tumores esporádicos, la deficiencia del sistema MMR se debe principalmente a la pérdida de la expresión de MLH1 como resultado de la hipermetilación de su promotor más que a mutaciones en los genes MMR (162, 170). Además, la metilación de *MLH1* se ha relacionado con el polimorfismo c.-93G>A de la región promotora de *MLH1* que se encuentra en una región clave para la transcripción (177, 178).

9. EPIGENÉTICA

Los cambios epigenéticos son cambios en el DNA que no modifican la secuencia de nucleótidos pero que producen cambios en su expresión. Estos cambios pueden ser transmitidos a las células hijas y, en la mayoría de los casos, se ha comprobado que pueden ser revertidos. Las principales modificaciones epigenéticas son la metilación del DNA, las modificaciones de las histonas, la remodelación de la cromatina y los RNAs de interferencia que intervienen en importantes procesos celulares (179). Además, las alteraciones epigenéticas, en ausencia de mutaciones en los genes correspondientes, están implicadas en el desarrollo de múltiples tipos de cáncer (180). Una de las alteraciones epigenéticas más importante en cáncer es el silenciamiento de los genes supresores tumorales mediante la hipermetilación de sus promotores, que suele estar asociada con la desacetilación de las histonas y la compactación de la cromatina, impidiendo así la transcripción génica (180).

9.1. METILACIÓN DEL DNA

La modificación epigenética más estudiada es la metilación del carbono 5 de los residuos de citosina de los dinucleótidos CpG. La metilación está mediada por la familia de enzimas DNA metiltransferasas (DNMT) que catalizan la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina al DNA (179).

Los dinucleótidos CpG suelen encontrarse agrupados en islas CpG localizadas principalmente en las regiones promotoras de más del 60% de los genes. En condiciones normales, las islas CpG se encuentran sin metilar permitiendo la expresión de los genes correspondientes (Figura 16). En general, la metilación de los promotores está asociada a un silenciamiento transcripcional mediado por el reclutamiento de proteínas como MBD (*Methyl-CpG Binding Domain*) que inducen modificaciones en las histonas y una estructura más cerrada de la cromatina, aunque la metilación también puede inhibir directamente la transcripción al impedir la unión de factores de transcripción (181). Sin embargo, algunos procesos fisiológicos requieren la metilación del DNA, como la impronta genética, la inactivación del cromosoma X o la metilación específica de ciertos genes en algunos tejidos durante el desarrollo (182, 183). Además de la regulación de la transcripción génica, la metilación del DNA también está

implicada en el mantenimiento de la integridad cromosómica mediante la metilación de elementos repetitivos (184).

Las dos principales alteraciones en el estado de metilación del DNA relacionadas con el desarrollo de tumores son la hipometilación de secuencias repetitivas, produciendo la reactivación de elementos transponibles e inestabilidad genética, y la hipermetilación de islas CpG de genes implicados en la regulación de procesos como el ciclo celular, la reparación del DNA, la adherencia e invasión celular, la apoptosis, el metabolismo de carcinógenos, la respuesta hormonal o la expresión de microRNAs (Figura 16) (180).

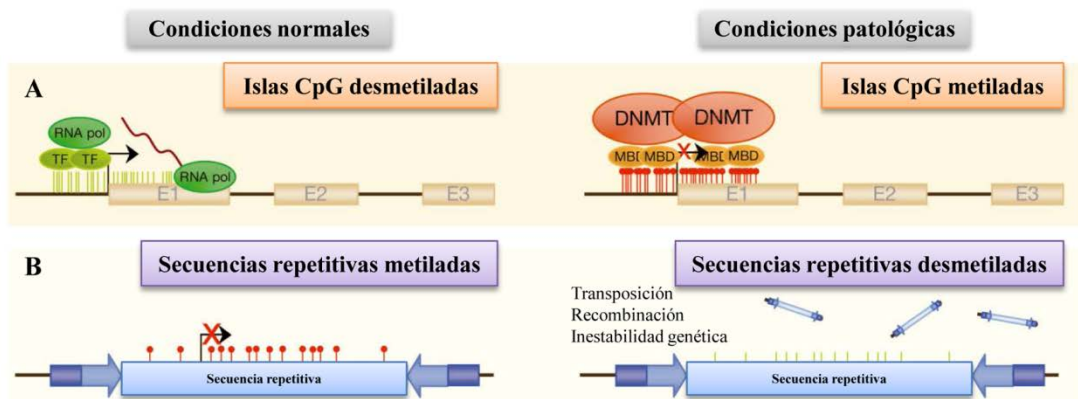


Figura 16. Patrones de metilación del DNA. A la derecha se muestra el estado de metilación de los promotores y de las secuencias repetitivas en condiciones normales. A la izquierda se observa la hipermetilación de los promotores y la desmetilación de regiones repetitivas relacionadas con el desarrollo tumoral.

En gliomas, muchas rutas se encuentran desreguladas debido a la hipermetilación de los promotores de genes como *p16*, *RB*, *PTEN*, *ARF*, *TP53*, *EMP3*, *GATA6*, *HOXA1* o *TES* (185, 186). Además, en el 85% de los glioblastomas se ha detectado un estado de hipometilación global y la expresión asociada de genes como *MAGE1* (*melanoma antigen gene*) o *IGF2* (*insuline growth factor 2*) (185, 186).

La metilación aberrante del gen *MGMT* (O⁶-metilguanina DNA metiltransferasa) en gliomas está relacionada con la respuesta al tratamiento con agentes alquilantes y el pronóstico de los pacientes (40, 41). La enzima *MGMT* se encarga de revertir la alquilación de la posición O⁶ de la guanina inducida por agentes quimioterápicos alquilantes como BCNU, procarbazona o temozolamida confiriendo resistencia al tratamiento por estos fármacos (40, 187). Sin embargo, aproximadamente

el 50% de los gliomas carecen de expresión de MGMT debido a la metilación de su promotor, aumentando la acumulación de los daños inducidos por agentes alquilantes (188). Así, la metilación del promotor de *MGMT* aumenta la sensibilidad de los gliomas al tratamiento con agentes alquilantes aumentando la supervivencia y el tiempo de progresión libre de enfermedad (40, 41).

9.2. MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE LAS HISTONAS

Los nucleosomas son las unidades estructurales de la cromatina esenciales para el empaquetamiento del DNA en el núcleo. Están formados por un octámero de histonas compuesto por dos dímeros H2A-H2B y un tetrámero H3-H4, que se encuentra rodeado de un segmento de DNA de 146 pb. Estabilizando el ensamblaje y el segmento de DNA de separación entre nucleosomas se encuentra la histona H1 (179).

Las histonas son proteínas globulares, excepto las colas amino terminales que son regiones desestructuradas susceptibles de sufrir diversas modificaciones post-traduccionales como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación o ADP-ribosilación (189). Estas modificaciones post-traduccionales son cambios epigenéticos dinámicos y reversibles con importantes funciones en la regulación de la transcripción, reparación y replicación del DNA, así como en el procesamiento alternativo del RNA o en la condensación de los cromosomas (189). La combinación de las modificaciones post-traduccionales de las histonas y el efecto que producen se conoce como hipótesis del código de histonas. La función de las modificaciones postraduccionales no depende sólo de los residuos modificados, sino también de la relación establecida con otras modificaciones generando patrones y efectos que están cambiando constantemente (190).

En relación con la regulación de la transcripción génica, las modificaciones más estudiadas son la acetilación de residuos de lisina y la metilación de residuos tanto de lisina como de arginina en las colas amino terminales de las histonas H3 y H4 (189). La metilación de las histonas está regulada por las histona metiltransferasas (HMTs) y está asociada tanto a la activación como a la represión de la transcripción génica en función de los residuos que se encuentren metilados y el grado de metilación (191). Los niveles de acetilación de las histonas dependen de la actividad de las histona acetiltransferasas

(HATs) y de las histona desacetilasas (HDACs) (Figura 17) (192). En general, la acetilación de las histonas está relacionada con una estructura de la cromatina menos condensada y un estado transcripcionalmente activo. Sin embargo, la desacetilación de las histonas aumenta las interacciones iónicas entre las cargas positivas de las histonas y las negativas del DNA, generando una estructura de la cromatina más compacta que provoca una represión de la transcripción al limitar el acceso de la maquinaria de transcripción (193).

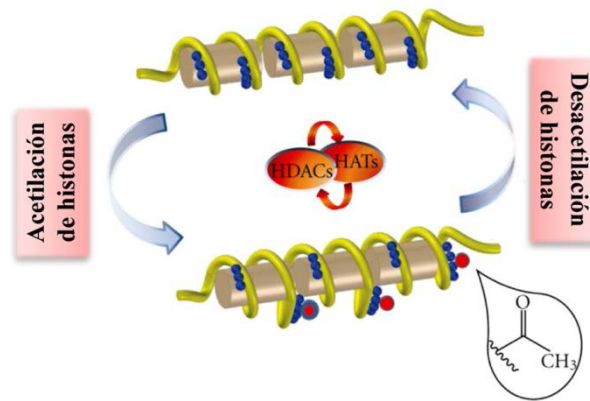


Figura 17. Estado de acetilación de las histonas determinado por el balance de la actividad de las HDACs y las HATs.

La superfamilia de las HDACs está formada por cuatro clases de acuerdo con su homología, expresión, localización o requerimiento de cofactor (194). La clase I de HDACs es la que participa principalmente en la regulación del remodelamiento de la cromatina, la transcripción, la inflamación y el metabolismo celular (195). Está compuesta por las proteínas HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8. HDAC1, HDAC2 y HDAC3 se expresan ubicuamente en todos los tejidos, HDAC1 y HDAC2 en el núcleo, y HDAC3 tanto en el núcleo como en el citoplasma. Las enzimas HDACs actúan formando parte de complejos multiproteicos con factores represores de la transcripción en los que también están presentes HATs, regulando de manera coordinada el remodelamiento de la cromatina y el control de la expresión génica. HDAC1 y HDAC2 forman parte de al menos tres complejos, mSin3A, NuRD y CoREST, mientras que HDAC3 forma parte de los complejos N-CoR y SMRT (195, 196). Además, las HDACs (principalmente las de clase II) están implicadas en la desacetilación de proteínas no histonas con importantes funciones en la regulación de la homeostasis celular (197).

Se han descrito diversas alteraciones en los patrones de modificaciones de las histonas que generan una desregulación de la expresión génica y están relacionadas con el desarrollo de diversos tipos de cáncer (185, 193). En general, se ha observado una disminución de los niveles de acetilación en cáncer debido a la sobreexpresión de las desacetilasas de clase I (HDAC1, HDAC2 y HDAC3). Esta sobreexpresión implica la disminución de los niveles de proteínas con funciones supresoras tumorales como p21, BAX o p53, y el aumento de HIF-1 α o VEGF favoreciendo la proliferación e invasión celular, la angiogénesis e inhibiendo la apoptosis (193, 196).

9.3. microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas secuencias endógenas de RNA no codificante, de entre 17-25 nucleótidos, que regulan post-transcripcionalmente la expresión de los RNAs mensajeros (mRNAs) de un elevado número de genes. Los miRNAs se unen a secuencias complementarias no codificantes localizadas en la región 3' UTR de los mRNAs provocando, generalmente, la disminución de la expresión o la anulación de la actividad del mRNA (198, 199).

La mayor parte de los genes que codifican los miRNAs se encuentran en regiones intrónicas, intergénicas o en orientación antisentido dentro de la secuencia exónica de algunos genes (199, 200). Sin embargo, otros miRNAs se encuentran organizados en “cluster” y se transcriben como una unidad policistrónica que luego es procesada (201). La RNA polimerasa II/III transcribe los microRNAs en el núcleo generando los pri-miRNAs, que son transcritos largos con estructura cerrada y regiones desapareadas que suelen estar protegidos por una caperuza en su extremo 5' y una cola poli A en su extremo 3'. Los pri-miRNAs son procesados por el complejo Drosha/DGCR8 a pre-miRNAs con forma de horquilla de aproximadamente 70 nucleótidos. Los pre-miRNAs son exportados al citoplasma donde el complejo Dicer/TRBP los convierte en dúplex de miRNA de unos 20 nucleótidos formados por la hebra de miRNA madura y la hebra no complementaria que es degradada (Figura 18) (202). Los miRNAs maduros se ensamblan con proteínas de la familia Argonauta (AGO) formando los complejos miRISC (*miRNA-induced silencing complexes*) que se unen al mRNA diana. Si la complementariedad del miRNA con la región 3' UTR del

mRNA no es perfecta, el complejo miRISC se mantiene unido al mensajero bloqueando la traducción. Sin embargo, si el apareamiento es perfecto, el complejo miRISC actúa como RNasa degradando el mRNA (203).

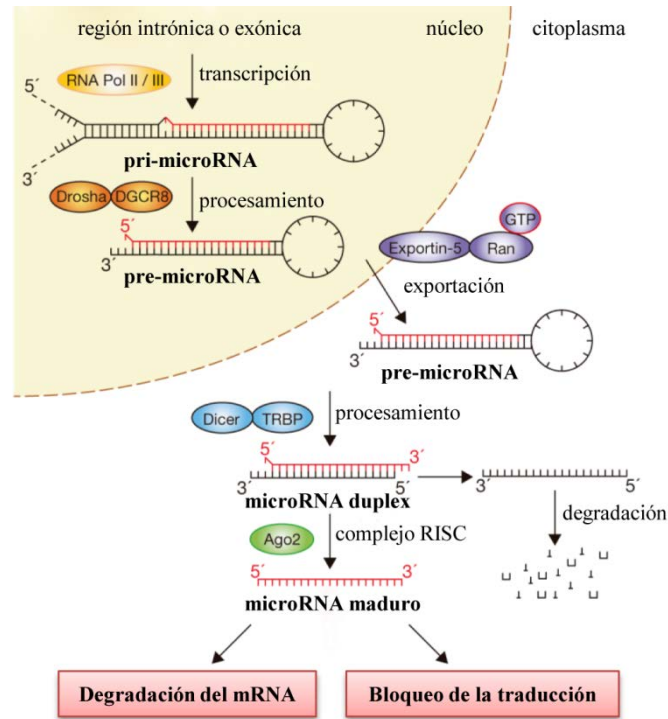


Figura 18. Biogénesis de los microRNAs.

Los miRNAs regulan más del 30% de los genes, estando implicados en múltiples funciones fisiológicas así como en el desarrollo de diversos tumores humanos. Participan en la regulación de procesos como el control del ciclo y la proliferación celular, el metabolismo, la apoptosis, la migración e invasión celular, la angiogénesis o el desarrollo de metástasis (199, 204). Existen diversos mecanismos tanto genéticos, epigenéticos o transcripcionales, como alteraciones en la maquinaria de biogénesis y procesamiento de los miRNAs, que pueden desregular la expresión de los miRNAs favoreciendo el desarrollo y la progresión tumoral (205). Así, los miRNAs pueden expresarse de manera aberrante y actuar como oncogenes o supresores de tumores en función de los mRNAs que regulan (206).

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Los astrocitomas son los tumores primarios malignos más frecuentes que afectan al sistema nervioso central (7, 17). Engloban desde tumores con bajo grado de proliferación e infiltración a los tejidos adyacentes hasta tumores altamente agresivos e invasivos, pero todos ellos presentan una elevada heterogeneidad morfológica y genética que aumenta a medida que la anaplasia se hace mayor (6). Los astrocitomas se producen como consecuencia de la acumulación secuencial de alteraciones genéticas y de la desregulación de rutas de señalización implicadas en la proliferación, supervivencia, invasión, angiogénesis y metabolismo celular, que normalmente se correlacionan con el grado clínico del tumor (2, 16, 25).

El único factor de riesgo medioambiental relacionado con el desarrollo de astrocitomas es la exposición a altas dosis de radiación ionizante (8-10) y determinados síndromes hereditarios poco frecuentes como el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Lynch o la neurofibromatosis también confieren una predisposición genética a desarrollar tumores cerebrales (13-15). Sin embargo, la mayor parte de los casos son de origen esporádico y de etiología desconocida (2).

Los astrocitomas son uno de los tumores más agresivos y devastadores y, a pesar del mayor conocimiento a nivel genético y molecular de estos tumores y al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, el pronóstico de los pacientes con astrocitomas continúa siendo desfavorable. En el caso de los astrocitomas de bajo grado la mediana de supervivencia es de 5-10 años, mientras que en los astrocitomas anaplásicos, en general, es inferior a los 2 años, y los glioblastomas presentan una supervivencia de aproximadamente un año tras su diagnóstico (16, 22).

Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos con el fin de profundizar en el conocimiento de la biología de los astrocitomas e intentar determinar nuevos factores que ayuden a predecir su desarrollo y evolución:

- Caracterizar las alteraciones implicadas en el inicio y la progresión de los astrocitomas presentes en las rutas de los genes TP53, EGFR/PI3K/PTEN e IDH1/IDH2 involucradas en la proliferación, supervivencia y metabolismo celular.
- Evaluar diferentes variantes polimórficas en genes implicados en la reparación de daños en el DNA como posibles factores de riesgo de desarrollar astrocitomas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

- Estudiar las alteraciones moleculares del sistema de reparación de emparejamientos erróneos implicadas en el desarrollo de astrocitomas esporádicos y su posible relación con el síndrome de Lynch.
- Analizar el papel de alteraciones epigenéticas como la metilación de regiones promotoras o la expresión de histona desacetilasas en el desarrollo de astrocitomas.
- Conocer las variables clínicas y genéticas que puedan estar implicadas en el pronóstico de los pacientes con astrocitomas así como en su respuesta al tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y MUESTRAS

Para la realización de este estudio se han analizado muestras de sangre periférica y de tejido tumoral de 105 pacientes diagnosticados de tumores primarios de SNC de origen glial en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario de Salamanca. La recogida de pacientes tuvo lugar entre los años 2000 y 2006, y se ha seguido su tratamiento y evolución desde el momento del diagnóstico hasta la actualidad. La población de estudio estaba compuesta por 2 astrocitomas pilocíticos, 22 astrocitomas de bajo grado, 20 astrocitomas anaplásicos y 61 glioblastomas multiformes, diagnosticados de acuerdo a la clasificación propuesta por la OMS para los tumores de SNC (6).

Para la realización de los estudios de asociación de polimorfismos se han analizado muestras de DNA extraído de sangre periférica de una muestra de casos mayor: 189 pacientes diagnosticados de tumores de SNC de origen glial (36 astrocitomas de bajo grado, 38 astrocitomas anaplásicos y 115 glioblastomas multiformes). Como grupo control hemos analizado muestras de DNA de sangre periférica de 200 individuos mayores de 60 años que no tuvieran historia personal ni familiar de cáncer de ningún tipo.

Todas las muestras fueron obtenidas previo consentimiento informado, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca. Las muestras de sangre se recogieron en tubos con EDTA de 10 mL y se conservaron a -4 °C hasta su procesamiento. El tejido tumoral fresco fue conservado a -80 °C hasta su procesamiento, y una parte fue fijado en formol y embebido en parafina para su posterior análisis por técnicas inmunohistoquímicas.

1.1. Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo tanto en las muestras de sangre periférica como en las muestras de tejido tumoral.

Para la extracción de DNA a partir de sangre periférica, se aisló la interfase de células nucleadas mediante centrifugación repetida y lisis osmótica de los eritrocitos

con ddH₂O estéril. El botón celular, que contiene únicamente las células nucleadas, se resuspendió en tampón Fornace (0.25 M Sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂), a una concentración estimada de 5×10^6 células/mL, que da la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos. Se añadió 10 mM de EDTA pH 8.0 que es un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas, 50 µg/mL de proteinasa K que degrada las proteínas y 1% de SDS que rompe las membranas celulares. La mezcla se incubó a 55 °C durante 8-16 horas, tras lo cual se purificó el DNA tratándolo con una mezcla de fenol tamponado a pH 8.0 y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y posterior centrifugación para separar las fases. El DNA atrapado en la fase acuosa se limpió de otros residuos celulares mezclándolo con CIAA y centrifugando para separar de nuevo las dos fases. Tras este paso, se añadió etanol absoluto frío a la fase acuosa para precipitar el DNA, que finalmente se resuspendió en ddH₂O estéril.

En el caso del tejido tumoral, se tomaron muestras de 100-200 mg y se homogeneizaron en tampón Fornace con un homogeneizador (*Polytron System PT 1200 E*, Kinematica AG). Una vez homogeneizado el tejido se añadió EDTA, proteinasa K y SDS siguiendo el mismo procedimiento que para la extracción de DNA a partir de sangre periférica.

La concentración de DNA de las muestras se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) que se basa en la medida de la absorbancia de la muestra a 260 nm. Además, el cociente entre las absorbancias A₂₆₀/A₂₈₀ permite determinar el grado de pureza de la muestra siendo los valores adecuados entre 1.8-2.0. Si la relación es más baja indica la presencia de proteínas o solventes orgánicos, mientras que valores superiores indican un exceso de RNA. En ambos casos se procedió a realizar una nueva purificación del DNA.

1.2. Extracción de RNA

Se extrajo RNA a partir de muestras de 100-200 mg de tejido tumoral siguiendo una modificación del método de Chomczynski y Sacchi (207). Para ello, las muestras se homogeneizaron en 1 mL de Trizol (Invitrogen) con la ayuda de un homogeneizador (*Polytron System PT 1200 E*, Kinematica AG) y se realizó una extracción selectiva del

RNA mediante separación de fases tras la adición de 200 μ L de cloroformo por cada mL de Trizol inicial. El RNA disuelto en la fase acuosa se precipitó con isopropanol y se resuspendió en ddH₂O tratada con DEPC (dietilpicrocarbonato 0.1%) que es un inhibidor de RNasas.

La integridad del RNA se comprobó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en condiciones desnaturalizantes de las muestras y la observación de las bandas de RNA ribosomal. La concentración de RNA de las muestras se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 260 nm y comprobando la presencia de contaminantes con la medida del ratio A260/A280.

1.3. Extracción de proteínas

Para la obtención de extractos proteicos se homogeneizaron muestras de tejido tumoral de 100-200 mg en tampón de lisis RIPA (1% Igepal, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS en PBS 1X) con inhibidor de proteasas Api (pepstatina A, aprotinina y leucepeptina) con la ayuda de un homogeneizador (*Polytron System PT 1200 E*, Kinematica AG). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 4 °C y se centrifugó a 15000 g durante 20 minutos a 4 °C, recuperando el sobrenadante que es el que contiene el extracto proteico total.

La concentración proteica de cada extracto se determinó mediante colorimetría utilizando el kit *Bio-Rad Protein Assay* (BioRad), basado en el método de Bradford (208).

2. ANÁLISIS DE MUTACIONES

2.1. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

Las muestras de DNA genómico obtenidas fueron amplificadas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando 12.5 μ L del sistema *PCR Master Mix 2X* (400 μ M de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂ y 50 unidades/mL de Taq DNA polimerasa en el buffer de reacción comercial a pH 8.5) (Promega), oligonucleótidos *forward* y *reverse* a una concentración final de 0.5 μ M cada uno y 100 ng de DNA

MATERIAL Y MÉTODOS

molde. El volumen final de reacción fue de 25 μ L y en paralelo, como control negativo, se preparó un tubo de reacción con todos los componentes excepto DNA.

Cada uno de los genes analizado por PCR fue amplificado con oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar cada exón de estudio y las regiones intrónicas flanqueantes (Tablas 2-11), utilizando un programa de PCR convencional adaptado a la temperatura de anillamiento de cada pareja de primers (Figura 19).

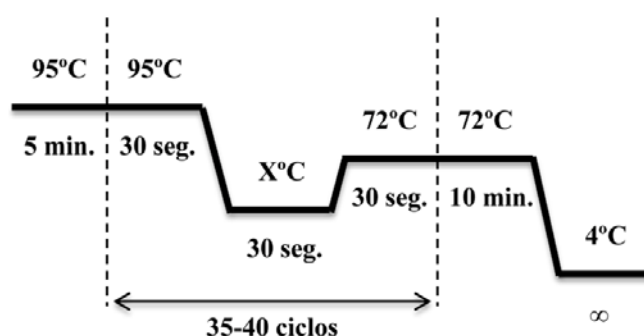


Figura 19. Programa de amplificación estándar utilizado donde X es la temperatura de anillamiento específica de cada pareja de oligonucleótidos.

Los genes estudiados mediante amplificación por PCR a partir de DNA genómico han sido *TP53*, *EGFR*, *PIK3CA*, *PTEN*, *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los exones estudiados del gen *TP53*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Exón	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
4	CAACGTTCTGGTAAGGACAA	GCCAGGCATTGAAGTCTCAT	58 °C	445 pb
5	GCCGTGTCCAGTTGCTTA	AGGAGGGGCCAGACCTAAGA	60 °C	351 pb
6	AGCGCTGCTCAGATAGCGAT	TAAGCAGCAGGAGAAAGCCC	58 °C	310 pb
7	AAGGCGCACTGGCCTCATCTT	GAGGTGGATGGGTAGTAG	60 °C	266 pb
8	GACCTGATTCCTTACTGCCT	TCTCCTCCACCGCTTCTT	56 °C	219 pb
9	GGAGACCAAGGGTGCAGTAT	GCCCCAATTGCAGGTAAAAC	58 °C	233 pb
10	GGTACTTGAAGTGCAGTTTCT	CAGCTGCCTTTGACCATGAA	58 °C	344 pb

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los exones estudiados del gen *EGFR*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Exón	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
18	CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC	GAGTTTCCCAAACACTCAGTCAAAC	55 °C	400 pb
19	ATCACTGGGCAGCATGTGGCAAC	AGACATGAGAAAAGGTGGGCCTGA	55 °C	234 pb
20	CCATGAGTACGTATTTTGAAGCTC	CATATCCCCATGGCAAACCTTTGC	53 °C	408 pb
21	CTAACGTTCCGACCCATAAGTCC	GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG	55 °C	415 pb

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los exones estudiados del gen *PIK3CA*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Exón	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
7	CCTTTTGGGGAAGAAAAGTG	GAGAGAAGGTTTGACTGCCATAA	54 °C	284 pb
9	TGAAAATGTATTTGCTTTTTCTGT	CCACAAATATCAATTTACAACCATTG	53 °C	401 pb
20	TGGGGTAAAGGGAATCAAAAG	CCTATGCAATCGGTCTTTGC	54 °C	525 pb

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los exones estudiados del gen *PTEN*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Exón	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
1	TCCTCCTTTTTCTTCAGCCAC	GAAAGGTAAAGAGGAGCAGCC	54 °C	147 pb
2	GCTGCATATTTCAATCAAATAA	ACATCAATATTTGAAATAGAAAATC	54 °C	166 pb
3	ACTACTCTAAACCCATAGAAGG	GACTTAATCGGTTTAGGAATACA	50 °C	357 pb
4	TTCCTAAGTGCAAAAGATAAC	TACAGTCTATCGGGTTTAAGT	54 °C	147 pb
5	TTTTTTTTTCTTATTCTGAGGTTATC	GAAGAGGAAAGGAAAAACATC	50 °C	312 pb
6	AGTGAAATAACTATAATGGAACA	GAAGGATGAGAATTTCAAGC	55 °C	232 pb
7	AATACTGGTATGTATTTAACCAT	TCTCCCAATGAAAGTAAAGTA	55 °C	220 pb
8	TTTTTAGGACAAAATGTTTCAC	CCCACAAAATGTTTAATTTAAC	55 °C	258 pb
9	GTTTTCATTTAAATTTCTTTC	TGGTGTTTTATCCCTCTTG	54 °C	245 pb

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los exones estudiados del gen *BRAF*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Exón	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
11	TCCCTCTCAGGCATAAGGTAA	TATTATGACTTGTCACAAT	53 °C	252 pb
15	AAACTCTTCATAATGCTTGCTCTG	GGCCAAAATTTAATCAGTGG	55 °C	231 pb

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los exones estudiados del gen *IDH1*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Exón	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
4	CGGTCTTCAGAGAAGCCATT	CACATTATTGCCAACATGAC	58 °C	122 pb

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los exones estudiados del gen *IDH2*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Exón	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
4	GATGGCGGCTGCAGTGGGACC	TAGGCCAGGAGCTCCAGTCCG	65 °C	267 pb

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los exones estudiados del gen *MLH1*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Exón	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
1	AGGTGATTGGCTGAAGGCAC	GCCCGTTAAGTCGTAGCCCT	56 °C	231 pb
2	ATGTACATTAGAGTAGTTGCAGACTGATAAATT	AGTTTCCAGAACAGAGAAAGGTCC	56 °C	221 pb
3	CAAGAAAATGGGAATTCAAAGAGAT	CTAACAAATGACAGACAATGTCATCAC	55 °C	241 pb
4	CCTTTGGTGAGGTGACAGTGG	CAGGATTACTCTGAGACCTAGGCAA	56 °C	221 pb
5	TTTTCCCCTGGGATTAGTATCTATC	CCCTGAAAACCTAGAAGCAATTTTATTT	53 °C	227 pb
6	GGACATCTTGGGTTTTATTTTCAAG	TGTTC AATGTATGAGCACTAGAACACA	56 °C	235 pb
7-8	GGGCTCTGACATCTAGTGTGTGTT	AAAATAATGTGATGGAATGATAAACCA	56 °C	417 pb
9	TCTGATTCCTTTGTAAATGTTTGAGTTTTG	CATAAAATCCCTGTGGGTGTTTC	55 °C	241 pb
10	CTGAGGTGATTCATGACTTTGTGT	GAGGAGAGCCGTGATAGAACATCTGT	56 °C	251 pb
11	GTGGGCTTTTTCTCCCCCT	CTCTCACGTCTGGCCGG	56 °C	281 pb
12	TTTTTTAATACAGACTTTGCTACCAGGAC	GTTTTATTACAGAATAAAGGAGGTAGGCTG	55 °C	436 pb
13	CCAAAATGCAACCCACAAAATT	AACCTTGGCAGTTGAGGCC	56 °C	282 pb
14	GGTGTCTCTAGTCTTGGTGCCTG	TGCCCTGTGCTCCCTGGA	56 °C	271 pb
15	CCCATTTTGTCCCAACTGGTT	GAGAGCTACTATTTTCAGAAACGATCAG	56 °C	203 pb
16	TGGGAATTCAGGCTTCATTTG	GCACCCGGCTGGAAATT	56 °C	292 pb
17	GCACTGGAGAAATGGGATTG	CCTCCAGCACACATGCATG	56 °C	221 pb
18	AGTCTGTGATCTCCGTTTAGAATGAG	TTGTATGAGGTCCTGTCTTAGTCCT	56 °C	242 pb
19	CATCAGCCAGGACACCAGTG	CGGAATACAGAGAAAGAACAACA	56 °C	288 pb

Tabla 10. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los exones estudiados del gen *MSH2*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Exón	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
1	TTCGACATGGCGGTGC	GTCCCTCCCCAGCACG	56 °C	251 pb
2	GAAGTCCAGCTAATACAGTGCTTGA	AAACACAATTAATTTCTTCACATTTTTATTTT	53 °C	301 pb
3	AGAGTTTGGATTTTTCCTTTTTGC	TCATGTCAATTAAGAGCCTTTCC	56 °C	431 pb
4	TTCATTTTTGCTTTTCTTATTCTTTT	ATATGACAGAAATATCCTTCTAAAAAGTCACTAT	50 °C	316 pb
5	ACTGGATCCAGTGGTATAGAAACTTC	GCTTCTTCAGTATATGTCAATGAAAACA	53 °C	285 pb
6	GCGTAGTAAAGTTTTCTACTAATGAGC	CATGTGGGTAAGTGCAGGTTACA	56 °C	251 pb
7	TGAGACTTACGTGCTTAGTTGATAAATTT	GCACATTGCCAAGTATATATTGTATGAG	53 °C	341 pb
8	TGATGCTTGTTTATCTCAGTCAAAAATT	AATCTACAAAACCTTCTTAAAGTGGCCTT	53 °C	275 pb
9	GTCTTTACCCATTATTTATAGGATTTGTCA	GTATAGACAAAAGAATTATTCCAACCTCC	56 °C	217 pb
10	ATTGAAAAATGGTAGTAGGTATTTATGGAA	CACATCATGTTAGAGCATTTAGGGA	54 °C	274 pb
11	ATATGTTTCACGTAGTACACATTGCTTCTA	TCAAATATCATGATTTTTCTTCTGTTACC	54 °C	249 pb
12	GGGTTTTGAATCCCAAATG	ACAAAACGTTACCCCAACA	56 °C	393 pb
13	TGGGGGTAATATGGGCAGTA	TCCTTCTCACAGGACAGAGACA	48 °C	448 pb
14	TGTGGCATATCCTTCCCAATG	AATAATTTATACTAAGTAAAGGCAATTACTGA	55 °C	452 pb
15	TACATAAATGCTGTCTTCTCATGC	AAAAACCTTCATCTTAGTGTCTGTTT	56 °C	311 pb
16	TAATTAATAATGGGACATTCACATGTGT	TACCTTCATCCATTACTGGGATTT	55 °C	230 pb

Tabla 11. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los exones estudiados del gen *MSH6*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Exón	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
1	TGTTGATTGGCCACTGGG	CAACCCCTGTGCGAGCCTC	62 °C*	463 pb
2	TAAGTGCCTTTAAGGAACTTGACCA	TCATATAGAAAAAGTCTGCCTGTCTG	60 °C	330 pb
3	CTGGTCTTGAAGTCTGGGAT	CCCCTTTCTTCCCCCATC	58 °C	289 pb
4.1	TGCACGGGTACCATTATAAAGTCA	GTATTCCTGGTTTCTGATGAAATGCTAG	58 °C	450 pb
4.2	GAAGGAAAACGCCCTCAGC	CAGTTGCCTTTCATGAATACCAG	58 °C	420 pb
4.3	CCACATGGATGCTCTTATTGGA	TCATCTGAAAACTGACCTATGAAAAACT	58 °C	420 pb
4.4	TTTGTGATACTTCACTGGGAAAGTT	CTCCTGATCAATAAGGCATTTTTTG	57 °C	420 pb
4.5	CTCTAGGTGTTGTGTCTTCTACCTC	TGAGTAGCCTCTCAAGATCTGGAA	57 °C	420 pb
4.6	CGAAGTTGTAGAGCTTCTAAAGAAGCT	GTCCTACAGCCAATTCTGTTGC	57 °C	480 pb
4.7	AGCCTCCTGGAAATACCTAGAGAAAAC	ACTTATTTTTAGGGATAATATACAGCTGGC	58 °C	420 pb
5	CACCTAGGCTGATAAAAACCCCC	GTATGTTATTCCTAATGTCACAAATGACTTT	57 °C	386 pb
6	AAGACAAAAGTTTATGAAACTGTTACTACCA	AGAAGCAAATATCTTTTATCACATCTAAAATG	56 °C	250 pb
7	TAACCTAGAAGATGAATTTATGTAATATGATTT	TTCAGATAATCTTCTATAAAAAATAGTTATTTGT	53 °C	224 pb
8	TGAGTTACTTCTTATGCATATTTTACT	AATATTAGCGATACATGTGCTAGCA	57 °C	275 pb
9	TGCTAGCACATGTATCGCTAATATT	GCATCATCCCTTCCCCTTTTA	56 °C	320 pb
10	GAAGGGATGATGCACTATGAAAAA	GTAGAAGGTAGATAAGAATTAAGGGTTAATTT	52 °C	296 pb

*para la amplificación del exón 1 se utilizó betaína 5M.

2.2. RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction)

Las reacciones de transcripción inversa y PCR se realizaron en varios pasos. En primer lugar, se sintetizó cDNA a partir de RNA utilizando el kit *ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se desnaturalizó a 70 °C durante 5 minutos una mezcla de 1 µg de RNA total y 0.5 µg del oligo (dT)₁₅, oligonucleótido que anilla en la cola poli A de los RNAs mensajeros. Se añadió 1 U de transcriptasa inversa *ImProm-IITM*, buffer *ImProm-IITM 1X*, 4 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 20 U del inhibidor de ribonucleasas *Recombinant RNasin[®]* y ddH₂O libre de RNAsas hasta un volumen final de 20 µL. La mezcla permaneció durante 5 minutos a 25 °C, temperatura que permite que el cebador anille con el RNA molde, y se incubó a 42 °C durante 1 hora para permitir la síntesis del cDNA mediante la transcriptasa inversa. Finalmente, la enzima fue inactivada desnaturalizando la mezcla durante 15 minutos a 70 °C. Por último, para comprobar que la síntesis de cDNA se había producido correctamente, se amplificó por PCR un fragmento del gen *GAPDH* que se expresa constitutivamente en todos los tejidos (Tabla 12).

Tabla 12. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de un fragmento del gen *GAPDH*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
GADPH	CCACCCATGGCAAATTCATGGCA	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC	55 °C	600 pb

MATERIAL Y MÉTODOS

Mediante RT-PCR hemos analizado la expresión de la variante EGFRvIII y la presencia de reordenamientos entre los genes *KIAA1549* y *BRAF*, así como el efecto de las mutaciones de *splicing* identificadas en el gen *PTEN* y la expresión de MSH6 en un caso con mutación el extremo 3' UTR. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando el sistema *PCR Master Mix 2x* (Promega) mediante un programa de PCR convencional adaptado a cada pareja de oligonucleótidos (Tablas 13-16).

Tabla 13. Oligonucleótidos empleados para el estudio de la expresión de EGFRvIII, condiciones de la PCR y tamaño del amplicón.

	Oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño PCR	Condiciones PCR
Exón 1 Forward	CTTCGGGGAGCAGCGATGCGAC	EGFR wt 1044 pb	56.5 °C anillamiento 1'30'' extensión 40 ciclos
Exón 9 Reverse	ACCAATACCTATTCGGTTACAC	EGFRvIII 243 pb	

Tabla 14. Oligonucleótidos empleados para el estudio del reordenamiento *KIAA1549-BRAF*, condiciones de la PCR y tamaño del amplicón.

	Oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño PCR	Condiciones PCR
KIAA1549 ex15F	CGGAAACACCAGGTCAACGG	KIAA1549ex16_BRAFex9: 710 pb KIAA1549ex16_BRAFex11: 536 pb KIAA1549ex15_BRAFex9: 392 pb	55 °C anillamiento 1' extensión 40 ciclos (Betaína 5M)
BRAF ex11R	GTTCCAAATGATCCAGATCCAATTC		
BRAF ex6F	TTGTGACTTTTGTGCGAAAGCTGC		
BRAF ex7R	AAGGGGATGATCCAGATGTTAGG	214 pb	

F: Forward, R: Reverse

Tabla 15. Oligonucleótidos empleados para el estudio de las mutaciones de *splicing* identificadas en el gen *PTEN*, condiciones de la PCR y tamaño del amplicón.

	Oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño PCR	Condiciones PCR
PTEN exón 1F	CAAGAGGATGGATTCTGACT	366 pb	55 °C anillamiento 1' extensión 40 ciclos
PTEN exón 5R	ATATGCACATATCATTACACCAG		
PTEN exón 5F	CTGGTGTAATGATATGTGCATAT	433 pb	
PTEN exón 8R	TACCCAAAAGTGAAACATTTTGTCTCT		

F: Forward, R: Reverse

Tabla 16. Oligonucleótidos empleados para el estudio de la expresión de MSH6, condiciones de la PCR y tamaño del amplicón.

	Oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño PCR	Condiciones PCR
MSH6 Forward	ATGTCGCGACAGAGC	1008 pb	58 °C anillamiento 1' 30'' extensión 35 ciclos
MSH6 Reverse	GTATTCTGGTTTCTGATGAAATGCTAG		

2.3. Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos amplificados mediante PCR y RT-PCR fueron separados por su tamaño molecular mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% en tampón TBE 0.5X (Tris 0.045 M, ácido bórico 0.045 M, EDTA 1.0 mM pH 8.0). Las muestras migraron en paralelo con un marcador de tamaño molecular derivado del DNA del fago Φ X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII que genera fragmentos de los siguientes tamaños: 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.072 Kb. La migración del DNA en el gel se monitorizó utilizando dos colorantes incluidos en el tampón de carga: el xileno cianol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 5 Kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5 Kb. Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron utilizando *SYBRSafe*[®] (1/10000) (Invitrogen), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emite fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (Figura 20).

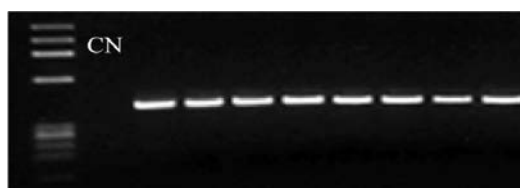


Figura 20. Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR correspondientes al exón 4 del gen *TP53*.

2.4. Electroforesis sensible a la conformación (CSGE-heterodúplex)

La detección de mutaciones en los genes *PI3KCA*, *PTEN* (exones 1 al 4), *BRAF*, *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* se llevó a cabo mediante CSGE- heterodúplex (*conformation-sensitive gel electrophoresis*) de los fragmentos amplificados por PCR siguiendo una modificación de la técnica descrita por Ganguly (209).

Los productos de PCR se desnaturalizaron a 95 °C y se renaturalizaron disminuyendo la temperatura 1 °C por minuto para permitir la formación de heterodúplex en el caso de individuos heterocigotos (Figura 21).

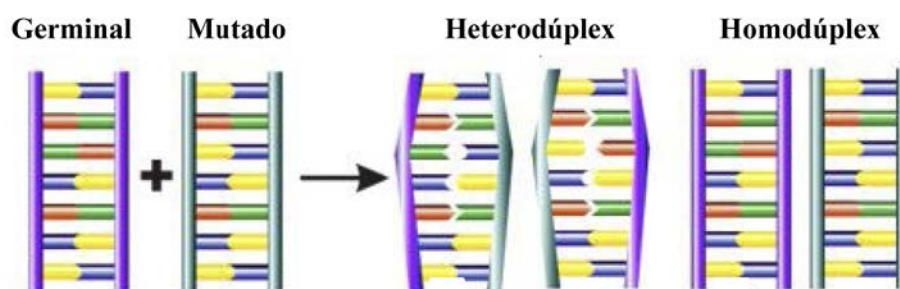


Figura 21. Formación de heterodúplex tras la desnaturalización y posterior renaturalización del producto de PCR en un individuo heterocigoto.

Las hebras madre, tras la desnaturalización, pueden renaturalizarse con su hebra complementaria correspondiente o con la hebra complementaria del otro alelo. Si existe un cambio de nucleótido en heterocigosis dentro del fragmento amplificado, la renaturalización puede generar heterodúplex, es decir, apareamiento entre dos hebras que son complementarias en todos los nucleótidos excepto uno, generando un desapareamiento en este punto y provocando un cambio en la conformación del DNA detectable por CSGE.

Las muestras de estudio desnaturalizadas, en paralelo con un control sano, fueron sometidas a electroforesis vertical en geles de acrilamida parcialmente desnaturalizantes (ddH₂O 7.705 mL, formamida 99% 5.98 mL, etilenglicol 99% 4.025 mL, TBE 10X 2.415 mL, *MDE*TM 2X (AT Biochem, Inc. USA) 20.125 mL, TEMED 36.8 µL, AMPS 25% 138 µL) a 180 voltios durante aproximadamente 21 horas. Finalmente, las muestras se visualizaron mediante la tinción con plata de los geles utilizando el kit *DNA Silver Staining* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los heterodúplex y homodúplex migran de manera diferencial en los geles de acrilamida, de manera que aquellas muestras que presentaron un patrón de migración diferente al control fueron secuenciadas para conocer la naturaleza de la alteración (Figura 22).

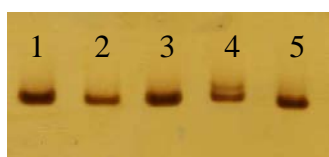


Figura 22. CSGE-heterodúplex correspondiente al exón 15 del gen *BRAF* en cinco pacientes. El paciente 4 muestra un patrón de migración anómalo.

2.5. Cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturizante (dHPLC)

El estudio de las mutaciones en el codón 132 del gen *IDH1* se realizó utilizando el sistema *WAVE*[®] (Transgenomic, UK), basado en la cromatografía líquida de intercambio iónico en fase reversa (210), acoplado al software de análisis (*Navigator*, Sistema *WAVE*, Transgenomic). Para ello, se amplificó mediante PCR la región de estudio del gen y los productos de PCR fueron desnaturizados y renaturalizados para permitir la formación de heterodúplex. Las muestras se inyectaron en la columna de dHPLC a una temperatura de desnaturalización ajustada de 58.6 °C y se eluyeron con acetato de trietilamonio (TEAA) y concentraciones crecientes de acetonitrilo. Los heterodúplex eluyen antes que los homodúplex debido a que tienen una unión más débil a la matriz, debido a su configuración más abierta causada por el desapareamiento de bases (Figura 23). Todos los resultados obtenidos en el estudio del exón 4 de *IDH1* mediante dHPLC fueron confirmados mediante secuenciación automática.

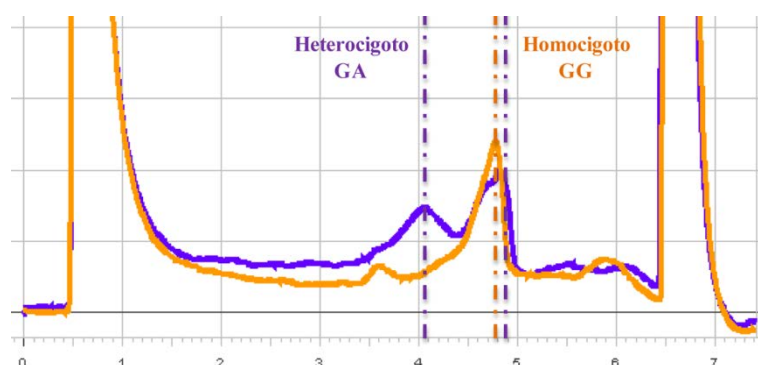


Figura 23. Análisis de las mutaciones en el codón 132 del gen *IDH1* mediante dHPLC. En la figura se observan los patrones diferenciales de una muestra homocigota germinal (1 pico) y de una muestra mutada en heterocigosis (2 picos). No se conocen mutaciones en homocigosis en esta posición.

2.6. Secuenciación automática

Los productos de PCR analizados mediante CSGE o dHPLC que mostraron un patrón de migración diferente fueron secuenciados para identificar la naturaleza de la variante encontrada. Además, estudiamos directamente por secuenciación automática la presencia de mutaciones en los genes *TP53*, *EGFR*, *PTEN* (exones 5 al 9) e *IDH2*, así como los productos amplificados mediante RT-PCR de los genes *EGFR*, *KIAA1549-BRAF*, *PTEN* y *MSH6*.

Los fragmentos de PCR fueron purificados previamente con la enzima *ExoSAP-IT*[®] (Affymetrix) o con el kit comercial *PureLink*[®] *PCR Purification Kit* (Life technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se prepararon muestras con 40-60 ng del producto de PCR purificado y 3 pmol del oligonucleótido correspondiente en un volumen final de reacción de 8 µL. La secuenciación automática se llevó a cabo en un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems).

En todas las muestras en las que se detectó una mutación, se analizó la muestra de DNA de sangre periférica del paciente correspondiente para conocer el origen somático o germinal de la mutación.

3. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

3.1. Discriminación alélica mediante PCR-RFLP

El estudio de polimorfismos en función de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphisms*) permite discriminar los alelos de un polimorfismo analizando el tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del producto de PCR con endonucleasas de restricción, que reconocen secuencias específicas en el DNA y lo escinden en ese punto.

Estudiamos mediante RFLP cuatro polimorfismos del gen *TP53*: IVS3-54ins16pb en el intrón 3 (rs17878362), c.215G>C (p.Arg72Pro) en el exón 4 (rs1042522), IVS6+62A>G en el intrón 6 (rs1625895) e IVS7+72C>T en el intrón 7 (rs12947788).

Para ello, se amplificó mediante PCR del fragmento de DNA correspondiente al intrón o exón donde se localiza cada polimorfismo con un programa de PCR convencional adaptado a la temperatura de anillamiento de cada pareja de oligos (Tabla 17). Posteriormente, se digirieron 13 µL del producto de PCR con 10 U (1 µL) de la enzima de restricción apropiada durante 4-6 horas a 37 °C en un volumen final de 20 µL. Los fragmentos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa a diferentes concentraciones en función del tamaño de los fragmentos.

Tabla 17. Oligonucleótidos empleados para el estudio de los polimorfismos del gen *TP53*, su temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón.

Polimorfismo	Oligonucleótido <i>Forward</i> (5'-3')	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (5'-3')	T ^a (X)	Tamaño PCR
IVS3-54ins16pb	ATGGGACTGACTTTCTGCTCTT	CTGGCATTCTGGGAGCTCA	56 °C	268 pb
Arg72Pro	TCTACAGTCCCCCTTGCCGT	CTGACCGTGCAAGTCACAGA	62 °C	291 pb
IVS6+62A>G	AGGTCTGGTTTGCAACTGGG	GAGGTCAAATAAGCAGCAGG	59 °C*	107 pb
IVS7+72C>T	GTGTTATCTCCTAGGTTGGC	AGACTTAGTACCTGAAGGGT	50 °C*	781 pb

*el tiempo de desnaturalización, anillamiento y extensión en cada ciclo fue de 1 minuto.

El polimorfismo localizado en el intrón 3, IVS3-54ins16pb, consiste en la inserción de la secuencia acctggagggtgggg. La discriminación alélica de este polimorfismo se realizó directamente mediante electroforesis del producto de PCR en geles de agarosa al 4% presentando tres genotipos diferentes (Figura 24A):

- Homocigoto Inserción de 16 pb: un fragmento de 268 pb.
- Homocigoto No Inserción de 16 pb: un fragmento de 252 pb.
- Heterocigoto No inserción/Inserción de 16 pb: dos fragmentos de 268 y 252 pb.

El polimorfismo c.215G>C (p.Arg72Pro) se analizó mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción BstUI (Bsh1236I, Fermentas), que reconoce el sitio de corte **CGCG**, y posterior electroforesis en gel de agarosa al 3% generando tres patrones diferentes (Figura 24B):

- Homocigoto CC (Pro/Pro): un fragmento de 291 pb.
- Homocigoto GG (Arg/Arg): dos fragmentos de 165 y 126 pb.
- Heterocigoto GC (Arg/Pro): tres fragmentos de 291, 165 y 126 pb.

El polimorfismo IVS6+62A>G se analizó mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción MspI (Fermentas), que reconoce la secuencia **CCGC**, y posterior electroforesis en geles de agarosa al 4% generando tres posibles genotipos (Figura 24C):

- Homocigoto AA: un fragmento de 107 pb.
- Homocigoto GG: dos fragmentos de 63 y 44 pb.
- Heterocigoto GA: tres fragmentos de 107, 63 y 44 pb.

El polimorfismo IVS7+72C>T se estudió mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción ApaI (Fermentas), que reconoce el sitio de corte

GGGCCC, y posterior electroforesis en geles de agarosa al 1.5% generando tres posibles genotipos (Figura 24D):

- Homocigoto TT: un fragmento de 781 pb.
- Homocigoto CC: dos fragmentos de 584 y 197 pb.
- Heterocigoto CT: tres fragmentos de 781, 584 y 197 pb.

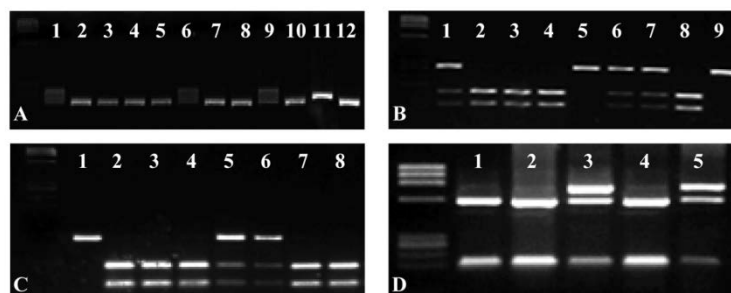


Figura 24. Análisis de los polimorfismos del gen *TP53* mediante PCR-RFLP. **A)** Electroforesis del producto de PCR para el análisis del polimorfismo IVS3-54ins16pb. **B)** Electroforesis del producto de digestión con la enzima BstUI para el análisis del polimorfismo c.215G>C (p.Arg72Pro). **C)** Electroforesis del producto de digestión con la enzima MspI para el análisis del polimorfismo IVS6+62A>G. **D)** Electroforesis del producto de digestión con la enzima ApaI para el análisis del polimorfismo IVS7+72C>T.

3.2. Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan

En la discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan, la amplificación y la detección del genotipo ocurren simultáneamente. Las sondas TaqMan son oligonucleótidos que hibridan específicamente con cada alelo y están marcadas con un fluorocromo donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado, y un aceptor (“*quencher*”) en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador cuando la sonda está intacta y ambos se encuentran próximos. Las sondas utilizadas en nuestro trabajo estaban marcadas con los fluorocromos VIC y FAM para cada alelo.

La reacción de PCR requiere además los mismos componentes que una reacción de PCR convencional (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y oligonucleótidos *forward* y *reverse*) y se lleva a cabo en termocicladores que incorporan un lector de fluorescencia. Durante la amplificación del DNA diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria y la DNA polimerasa, que tiene actividad 5'-3' exonucleasa, al

desplazarse a lo largo de la cadena, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Al quedar separados, la fluorescencia emitida por el fluorocromo es captada por el lector (Figura 25). Además, la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado, permitiendo en todo momento conocer y registrar la cinética de la reacción de amplificación.

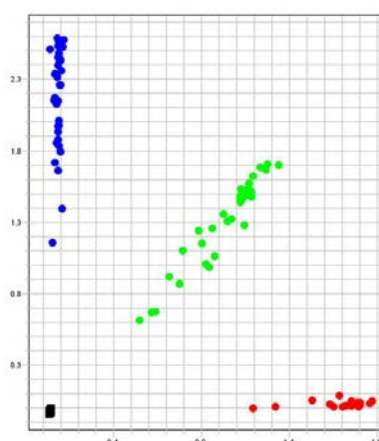


Figura 25. Representación de los resultados de la discriminación alélica con sondas TaqMan del polimorfismo c.2251A>C (p.Lys751Gln) del gen *ERCC2*. Cada nube de puntos representa uno de los genotipos posibles: los azules son homocigotos AA, los verdes son heterocigotos AC y los rojos homocigotos CC.

Mediante esta técnica analizamos diversos polimorfismos de genes implicados en mecanismos de reparación del DNA (Tabla 18).

Tabla 18. Polimorfismos estudiados mediante discriminación alélica con sondas TaqMan.

Gen	Polimorfismo estudiado	Sonda TaqMan (Applied Biosystems)
<i>ERCC1</i>	c.354T>C (p.Asn118Asn) rs11615	C_2532959
<i>ERCC2</i>	c.2251A>C (p.Lys751Gln) rs13181	C_3145033
<i>ERCC6</i>	IVS5-8767 A>C rs4253079	C_32308392
<i>APEX1</i>	c.444T>G (p.Asp148Glu) rs1130409	C_8921503
<i>XRCC1</i>	c.1196A>G (p.Gln399Arg) rs25487	C_622564
<i>XRCC3</i>	c.722C>T (p.Thr241Met) rs861539	C_8901525
<i>MLH1</i>	c.-93G>A rs1800734	C_7535141

La reacción de genotipado se llevó a cabo con el sistema *TaqMan Genotyping Master Mix 2x* (Applied Biosystems), en un volumen final de 10 μL , y se realizó en el equipo *Step One Plus Real Time PCRTM* (Applied Biosystems) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante para este tipo de estudios.

4. PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR convencional utilizada para la cuantificación tanto de DNA como de RNA que permite determinar el número de copias de un gen o sus niveles de expresión mediante el uso de los primers específicos.

Las reacciones de amplificación se producen en presencia de un agente intercalante del DNA o sondas fluorescentes cuya señal es proporcional a la cantidad de producto amplificado, permitiendo así detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de sus ciclos. Mediante el análisis de la cinética de la PCR podemos determinar el número de copias del fragmento de interés al inicio de la reacción a través del ciclo umbral (Ct). El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde (Figura 26A).

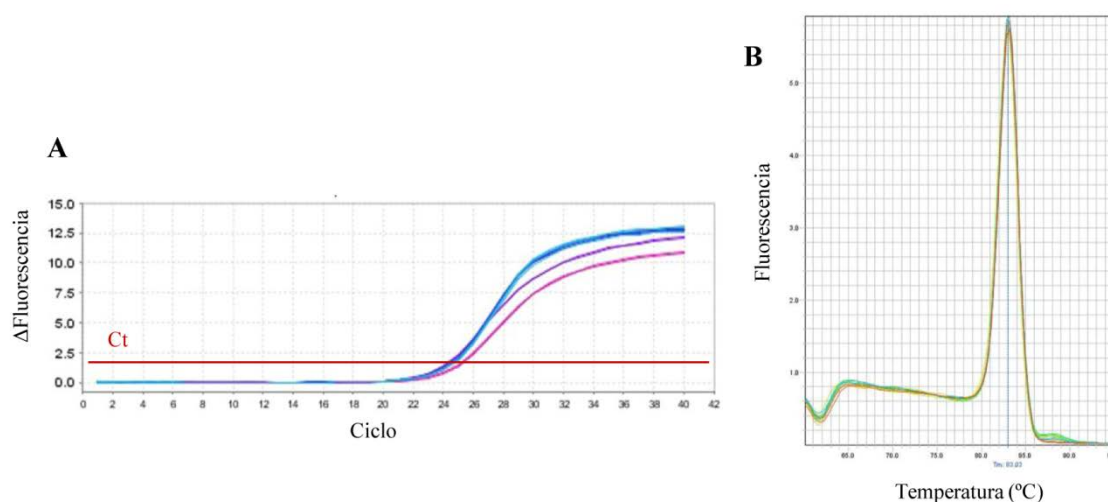


Figura 26. **A)** Curva de amplificación de la reacción de PCR a tiempo real donde se representa la fluorescencia emitida respecto al número de ciclos. En rojo se muestra el ciclo umbral (Ct). **B)** Representación de una curva de *melting* para del producto de amplificación donde se representa la temperatura frente a la fluorescencia.

Simultáneamente a la reacción de amplificación del fragmento del gen de interés, se lleva a cabo la amplificación de un gen control endógeno para normalizar posibles variaciones de la cantidad de DNA añadido a cada reacción. Para la cuantificación, se emplea el método $\Delta\Delta C_t$ donde se compara el valor del C_t del gen problema y el gen de referencia en cada muestra tumoral (ΔC_t) y, posteriormente, se comparan los ΔC_t de cada muestra tumoral con respecto a una muestra de referencia (DNA de sangre periférica). Esto permite determinar cambios relativos en la carga genética como pérdidas de heterocigosidad, grandes deleciones o amplificaciones en el gen de interés.

Esta técnica se ha empleado para analizar la pérdida de heterocigosidad en aquellos tumores que presentaron mutaciones homocigotas en alguno de los genes estudiados. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μL , utilizando *FastStart Universal SYBR Green Master 2x (Rox)* (Roche), 0.5 μM de cada oligonucleótido y 15 ng de DNA, en un termociclador *Step One Plus Real Time PCRTM* (Applied Biosystems). Se hicieron tres réplicas de cada muestra y como control endógeno en cada estudio, en lugar de un único gen, se amplificaron varios genes localizados en distintos cromosomas (Tabla 19), debido a la elevada inestabilidad cromosómica de los astrocitomas.

Tabla 19. Genes de referencia, localizaciones cromosómicas, oligonucleótidos empleados y condiciones de la PCR.

Gen de referencia	Localización cromosómica	Oligonucleótidos (5'-3')	Condiciones PCR
36B4	12q24	F: CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC R: CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	95 °C 10 min. 95 °C 15 seg. } x 40 ciclos 60 °C 1 min. 72 °C 30 seg. } <u>Curva de melting:</u> Aumento de 0.3 °C cada 15 seg.
LEMD3	12q14.3	F: GCGGCTGCCGGGAGTCTAGACAG R: GGTAGGTATGATTGGAGCCCG	
FBN1	15q21.1	F: AAATCAACTCCTGTGAGCTGT R: ATCGAAGAAAATCCATCAGC	
IDH1	2q34	F: CGGTCTTCAGAGAAGCCATT R: CACATTATTGCCAACATGAC	
IDH2	15q26.1	F: GATGGCGGCTGCAGTGGGACC R: TAGGCCAGGAGCTCCAGTCG	
LQT3	3p22.2	F: TCAAGCGAGGTACAGAATTAATG R: GGGCTTTCAGATGCAGACACTGAT	

F: Forward, R: Reverse

Para asegurar que la amplificación era específica, al final de cada proceso de termociclado se realizó una curva de *melting* que consiste en una desnaturalización y una progresiva renaturalización del producto de PCR amplificado (Figura 26B). Si

existieran varios productos de amplificación, se desnaturalizarían a distintas temperaturas dando diferente señal en el proceso de *melting*.

5. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

La inestabilidad de microsatélites (MSI) se determinó mediante amplificación por PCR de 8 marcadores que incluyen los recomendados en el panel de Bethesda: BAT25, BAT26, BAT40, D2S123, D5S346, D17S250, MYCL y PAX6, en muestras de DNA de sangre periférica y de tejido tumoral de cada paciente. Los extremos 5' de los oligonucleótidos *forward* estaban marcados con diferentes fluorocromos (Tabla 20).

Tabla 20. Marcadores utilizados en el estudio de MSI, localización cromosómica, tipo de repeticiones de la región microsatélite, fluorocromo utilizado, secuencia de oligonucleótidos y tamaño aproximado del producto de PCR.

Marcador	Locus	Tipo de repetición	Fluorocromo	Oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño PCR
BAT25	4q12	mononucleótido	TET	F: *TCGCCTCCAAGAATGTAAGT R: TCTGCATTTTAACTATGGCTC	110-130
BAT26	2p16	mononucleótido	FAM	F: *TGACTACTTTTGACTTCAGCCACC R: ATTCAACATTTTTAACCC	100-120
BAT40	1p12	mononucleótido	HEX	F: *ATTAACCTCCTACACCACAAC R: GTAGAGCAAGACCACCTTG	125-130
D2S123	2p21	dinucleótido	FAM	F: *AAACAGGATGCCTGCCTTTA R: GGACTTTCACCTATGGGAC	200-230
D5S346	5q21-22	dinucleótido	FAM	F: *ACTCACTCTAGTGATAAAATCGGG R: AGCAGATAAGACAGTATTACTAGT	100-130
D17S250	17q11.2	dinucleótido	FAM	F: *GGAAGAATCAAATAGACAAT R: GCTGGCCATATATATATTTAAACC	140-170
MYCL	1p34.4	tetranucleótido	HEX	F: *TGGCGAGACTCCATCAAAG R: CTTTTTAAGCTGCAACAATTTTC	160-170
PAX6	11p13	tetranucleótido	HEX	F: *ACTTCTAGGACTCATTTC R: CTGAATTAACACAATATTTTC	130-140

F: *Forward*, R: *Reverse*

Las reacciones de amplificación se realizaron con el sistema *Go Taq[®] Hot Start Polymerase* (Promega), en un volumen final de 10 µL, utilizando un programa especial de PCR (Figura 27).

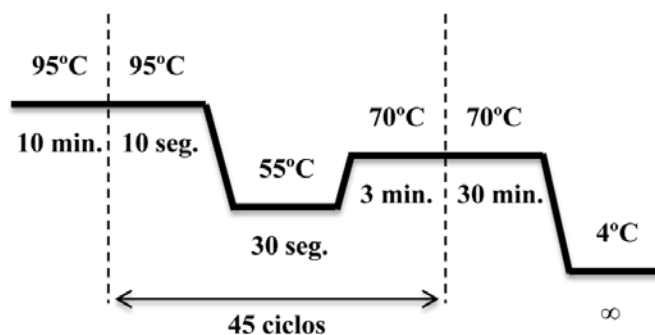


Figura 27. Representación del programa utilizado para la amplificación de los 8 marcadores microsatélites.

Los productos de PCR (2 μ L) se resuspendieron con 0.2 μ L de marcador de tamaño ROX *GenScan350* (Applied Biosystems) en formamida hasta un volumen final de 12 μ L, y se separaron en un secuenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Los resultados se visualizaron con el programa Peak Scanner v1.0 y se compararon los electroferogramas procedentes de las muestras de DNA de sangre periférica con los procedentes de tejido tumoral para ver diferencias de tamaño de secuencia o de pico (Figura 28) (211).

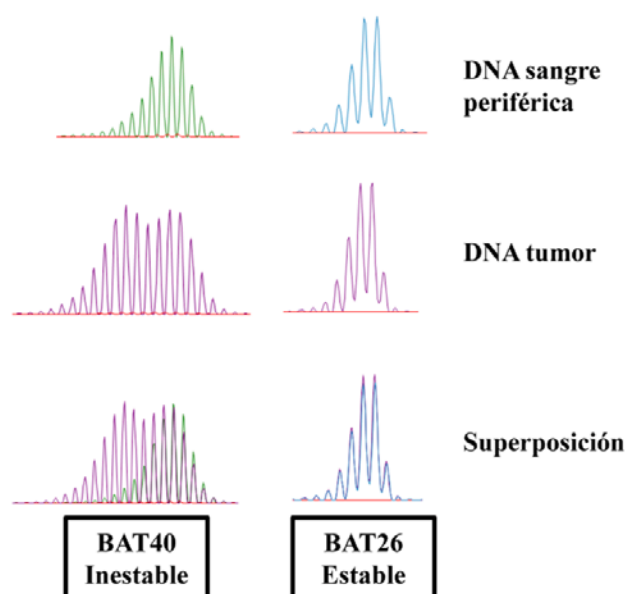


Figura 28. Electroferograma de dos marcadores, BAT40 y BAT26, utilizados para el análisis de la inestabilidad de microsatélites, donde se compara el patrón de la muestra de DNA de sangre periférica con la de tejido tumoral del mismo paciente.

Los tumores fueron clasificados como altamente inestables (MSI-High), cuando más del 30% de los marcadores analizados mostraron inestabilidad, baja inestabilidad (MSI-Low), cuando menos del 30% presentaron inestabilidad, y estables (MSS), cuando ninguno de los marcadores fue inestable (176).

6. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DE REGIONES PROMOTORAS MEDIANTE MS-MLPA

El método MS-MLPA (*Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) es una técnica especial derivada del MLPA donde se estudia el

estado de metilación de los promotores de los genes sin necesidad de tratamientos previos del DNA con bisulfito (212). Este método se compone de cinco etapas: desnaturalización del DNA, hibridación de las sondas al DNA, ligación de las sondas, digestión con la enzima HhaI y amplificación final. Las sondas utilizadas son de dos tipos, unas sondas específicas de metilación con sitios de reconocimiento para la enzima HhaI (5' GCGC 3') y otras sondas que no se ven afectadas por la enzima HhaI.

Tabla 21. Sondas utilizadas del kit *SALSA MS-MLPA probemix ME011-B1* para los estudios de MS-MLPA, localización cromosómica, presencia de sitio de reconocimiento HhaI y tamaño del fragmento generado durante la amplificación.

Sonda SALSA MS-MLPA	Cromosoma	Sitio HhaI	Tamaño (nt)
CTTN probe 03896-L00020	11q13.3	-	130
KCNJ6 probe 03797-L04594	21q22.13	-	136
PMS2 probe 07935-L16571	7p22.1	+	142
MLH1 probe 01685-L01265	3p22.2	-	148
PMS2 probe 11966-L13112	7p22.1	+	154
MSH6 probe 06228-L05731	2p16.3	+	160
MLH1 probe 01686-L15580	3p22.2	+	166
MGMT probe 14133-L15736	10q26.3	+	172
TNFRSF1A probe 00554-L13113	12p13.31	-	178
MSH2 probe 06227-L07711	2p21	+	184
PROKR2 probe 11954-L12774	20p12.3	-	190
MLH1 probe 06222-L07712	3p22.2	+	196
MGMT probe 05670-L14276	10q26.3	+	202
MSH6 probe 06230-L05733	2p16.3	+	208
MGMT probe 12250-L14205	10q26.3	+	214
MSH3 probe 07940-L14208	5q14.1	+	220
PAH probe 02334-L13114	12q23	-	232
MLH1 probe 07187-L07710	3p22.2	+	238
MSH2 probe 11634-L12398	2p21	-	247
SEPT9 probe 09646-L09804	17q25.3	-	256
MLH1 probe 06221-L01747	3p22.2	+	265
MSH2 probe 06142-L00599	2p21	+	274
MSH3 probe 11947-L00795	5q14.1	-	283
MLH1 probe 02258-L01745	3p22.2	+	292
MSH6 probe 06229-L05732	2p16.3	+	301
CACNA1A probe 09065-L15938	19p13.2	-	310
TSC1 probe 04324-L03897	9q34.13	-	319
KCNQ1 15055-L04802	11p15.5	-	328
PMS2 probe 07934-L16147	7p22.1	+	339
MGMT probe 13716-L15582	10q26.3	+	346
MLH3 probe 07941-L07722	14q24.3	+	355
CELF2 region probe 01234-L00781	10p14	-	364
ABCB4 probe 04727-L04144	7q21.12	-	373
FBN1 probe 02459-L01903	15q21.1	-	382
MGMT probe 14136-L12791	10q26.3	+	391
MSH2 probe 06141-L13115	2p21	+	400
MGMT probe 14135-L16573	10q26.3	+	409
TSC2 probe 13553-L12763	16p13.3	-	418

Mediante esta técnica analizamos el estado de metilación de los promotores de los genes *MGMT*, *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* utilizando el kit *SALSA MS-MLPA probemix ME011-B1 Mismatch Repair genes (MMR)* (MRC-Holland, Amsterdam, The

Netherlands). Este kit contiene 6 sondas específicas del promotor de *MGMT*, 6 del promotor de *MLH1*, 4 del promotor de *MSH2*, 3 del promotor de *MSH6* y 16 sondas de referencia que sirven como control interno del proceso (Tabla 21). Además, incluye 4 fragmentos que sirven para determinar que la cantidad de DNA empleada, así como la desnaturalización e hibridación del proceso, son correctas.

Todas las reacciones se llevaron a cabo según las condiciones especificadas por el fabricante utilizando 100 ng de DNA tumoral. En paralelo, la mitad de la muestra fue ligada y digerida, mientras que la otra mitad no se digirió para realizar posteriormente la comparación de los resultados.

Se mezclaron 2 μ L del producto de PCR, con 10 μ L de formamida y 0.2 μ L del marcador de tamaño ROX *GenScan500* (Applied Biosystems) para su separación en un secuenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), y los resultados se visualizaron mediante el programa Peak Scanner v1.0 (Figura 29).

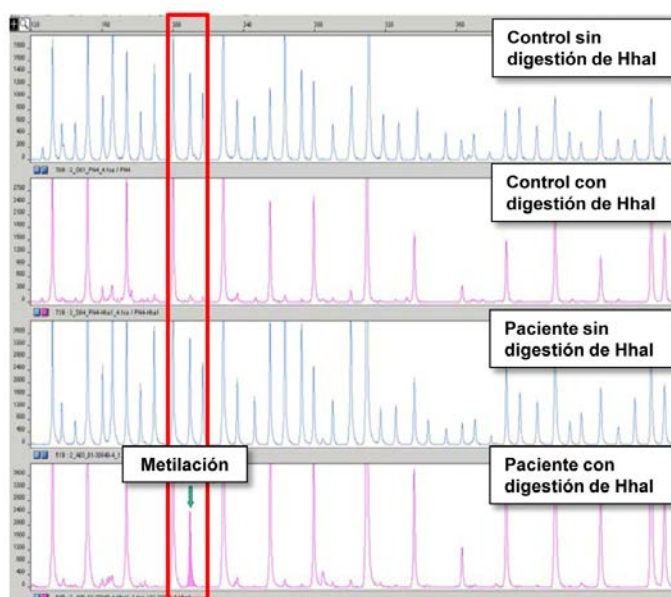


Figura 29. Electroferogramas de las reacciones de MS-MLPA en una muestra de DNA metilado y una muestra control sin metilar, sometido o no a digestión con la enzima HhaI.

El análisis del estado de metilación de los promotores se realizó comparando el valor obtenido de la normalización de los picos de las muestras no digeridas frente a las muestras digeridas (ratio de metilación), siguiendo el método descrito por Jeuken et al. (212). Se calculó el valor mediano de todas las sondas de cada promotor y se consideró

que existía hipermetilación del promotor cuando los valores fueron superiores a 0.75. Para el análisis de la metilación del promotor del gen *MLH1*, únicamente se consideraron las sondas 06222-L07712 y 01686-L15580 (localizadas en las posiciones -246 y -13), correspondientes a las región C y D del promotor, que son las que se encuentran relacionadas con el silenciamiento del gen (213).

7. CLONACIÓN EN VECTORES DE EXPRESIÓN

El estudio de la pertenencia alélica de mutaciones en las muestras de tumor que presentaron más de una mutación en el mismo gen, se llevó a cabo mediante la clonación del producto de PCR de los exones correspondientes en el vector pGEM[®]-T Easy.

Además, con el fin de caracterizar del comportamiento de la mutación c.*(24_28)delGTTGA localizada en el extremo 3' UTR del gen *MSH6*, realizamos un estudio *in vitro* de la actividad luciferasa. Para ello, amplificamos el extremo 3' UTR de *MSH6* con los oligos *forward* 5' GGGTCTAGACTGACTACATTGGAAGCTTT 3' y *reverse* 5' CGGGATCCTATATTGTGGAGTATTCAATAACC 3' que incorporan los sitios de corte de las enzimas de restricción XbaI y BamHI. El producto de PCR lo clonamos primero en el vector pGEM[®]-T Easy para separar el alelo mutado del germinal y, posteriormente, subclonados ambos extremos en el vector pGL3-promoter.

- **Clonación en el vector pGEM[®]-T Easy**

El vector pGEM[®]-T Easy (Promega) está constituido por una cadena doble de DNA lineal que permite ligar en sus extremos productos de PCR sin necesidad de que éstos sean manipulados previamente. Además, este vector ofrece la posibilidad de selección por color de los eventos de ligación, ya que el sitio de clonación interrumpe el operón *Lac*, y de selección de transformación, ya que contiene un gen de resistencia a ampicilina (*Ampr*) (Figura 30).

Los productos de PCR se ligaron con el vector pGEM[®]-T Easy empleando para la reacción de ligación 50 ng del vector, 1 U de ligasa T4 (Fermentas), buffer de reacción 1X (30 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, 10%

polietilenglicol, pH 7.8), 60-100 μg de producto de PCR y hasta 10 μL de ddH₂O. La reacción de ligación se dejó durante 3-4 horas a temperatura ambiente, o bien toda la noche a 15 °C.

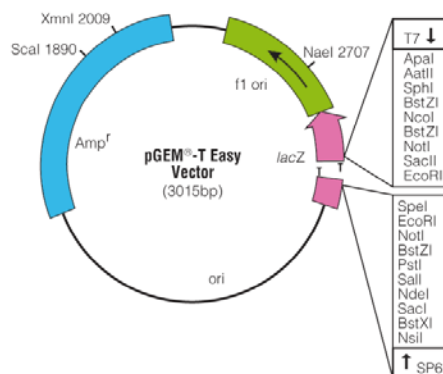


Figura 30. Representación del vector de clonación pGEM[®]-T Easy.

- **Preparación y transformación de células competentes**

Las reacciones de ligación fueron utilizadas para la transformación de la cepa bacteriana competente DH5 α derivada de *E. coli*. Para la preparación de la cepa competente, se sembró una colonia de la cepa en medio 2xTY y se dejó crecer a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ aproximada de 0.6. El cultivo se centrifugó a 1200 g durante 10 minutos a 4 °C. El botón celular obtenido se resuspendió en 100 mL de CaCl₂ 100 mM a 4 °C y, tras una nueva centrifugación, las bacterias se resuspendieron en 10 mL de CaCl₂ 100 mM.

Para la transformación, se incubaron 5 μL de la reacción de ligación con 30 μL del cultivo de bacterias competentes durante una hora en hielo. Pasado este tiempo, la mezcla se sometió a un choque térmico de 42 °C durante 2 minutos, se añadieron 300 μL de medio 2xTY y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Las bacterias transformadas se sembraron junto con 50 μL de IPTG (20 mg/mL), inductor de la transcripción del operón *Lac*, y 50 μL del sustrato XGal (20 mg/mL) en medio sólido preparado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina para llevar a cabo la selección de la transformación. Las placas de cultivo se incubaron en una estufa a 37 °C durante 12-16 horas.

- **Extracción de DNA plasmídico de colonias transformadas**

Las colonias blancas que no adquirieron color azul debido a que la clonación del inserto interrumpía la secuencia codificante del operón *Lac* presente en el vector pGEM[®]-T Easy, se sembraron en 5 mL de medio 2xTY suplementado con ampicilina. Los cultivos se dejaron crecer a 37 °C en agitación constante durante 6-16 horas y se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm. Los plásmidos se aislaron utilizando el kit comercial *PlasmidPrep* (GeneDan) según las especificaciones del fabricante. Para comprobar que los plásmidos contenían inserto se digirieron con las enzimas de restricción *ApaI* y *SacI* (Fermentas), cuyos sitios de corte se encuentran localizados a ambos lados del inserto, y posterior electroforesis en gel de agarosa al 2%. Aquellos plásmidos con insertos del tamaño esperado se secuenciaron usando los oligonucleótidos universales del vector pGEM[®]-T Easy, T7 y SP6.

- **Clonación en el vector pGL3-PROMOTER**

El extremo 3' UTR del gen *MSH6* insertado en el vector pGEM[®]-T Easy fue clonado posteriormente en el vector de expresión pGL3-Promoter (Promega), que contiene el gen reportero de la luciferasa (Figura 31). Para ello, utilizamos los sitios de restricción *XbaI* y *BamHI* que permiten clonar en fase el extremo 3' UTR de *MSH6* con el gen de la luciferasa.

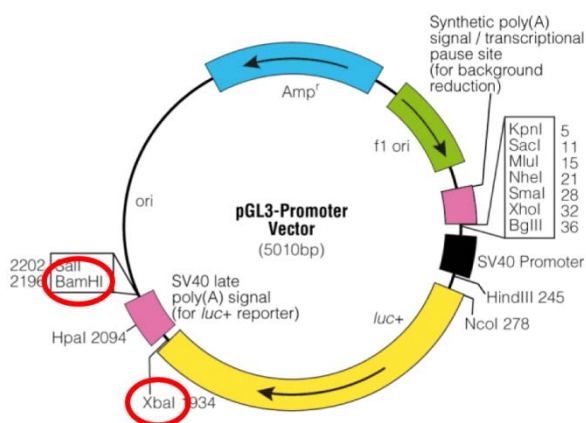


Figura 31. Representación del vector pGL3-Promoter que contiene el gen reportero de la luciferasa, con los sitios de corte *XbaI* y *BamHI* utilizados para la clonación.

Se llevó a cabo la digestión del vector pGL3-Promoter y del vector pGEM-T[®] Easy con el extremo 3' UTR de *MSH6* con 10 U de las endonucleasas XbaI y BamHI (Fermentas), buffer de reacción Tango 1X, 2 µg DNA y ddH₂O hasta un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó durante 6-8 horas a 37 °C y los productos resultantes de la digestión se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. La banda del vector pGL3-Promoter y las de los extremos 3' UTR germinal y mutado de *MSH6* se recortaron y purificaron del gel utilizando el kit *GENECLEAN[®] III* (MP Biomedicals).

La ligación del extremo 3' UTR de *MSH6* con el vector pGL3-Promoter se llevó a cabo utilizando una relación molar vector:inserto 1:5 con una cantidad de 100 ng de vector, 1 U de ligasa T4 (Fermentas) y buffer de reacción 1X. La reacción de ligación se dejó toda la noche a 15 °C y, posteriormente, se realizó la transformación y la selección de colonias, en este caso únicamente por ampicilina, siguiendo el protocolo anteriormente descrito. La comprobación de la eficiencia de la ligación se realizó mediante la digestión de los plásmidos aislados con las enzimas XbaI y BamHI. Aquellos plásmidos que contenían el inserto del tamaño adecuado fueron secuenciados para su comprobación y se purificaron con el kit *PureYield[™] Plasmid Maxiprep System* (Promega), con el cual se obtienen plásmidos con una concentración y pureza suficientes para su uso en transfecciones de líneas celulares.

8. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

Para la caracterización del efecto de la mutación c.*(24_28)delGTTGA del extremo 3' UTR del gen *MSH6* en los niveles de expresión de la proteína MSH6, realizamos un estudio *in vitro* de la actividad luciferasa.

Las líneas celulares utilizadas fueron COS-1, derivada de fibroblastos de mono verde africano, y T98G, derivada de glioblastoma multiforme. Ambas líneas celulares fueron crecidas en medio DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*) (Lonza) suplementado con 10% FBS (suero bovino fetal) y 1% de Penicilina/Estreptomomicina a 37 °C y 5% de atmósfera de CO₂.

La transfección transitoria de los plásmidos pGL3-promoter con las formas germinal y mutada del extremo 3' UTR de *MSH6*, obtenidos como se ha descrito previamente, se llevó a cabo en el momento que las células alcanzaron el 70-80% de confluencia. El método empleado para la transfección fue *FuGene*[®] *HD* (Roche), en una proporción 3:1, que es una combinación de lípidos y otros componentes que permiten la transfección de hasta 2 µg de DNA. Así, 1000 ng de cada una de las variantes y el vector pGL3-promoter sin modificar fueron cotransfectados con 10 ng del plásmido utilizado como control interno, pRL-CMV (plásmido que contiene el gen reportero de renilla), en una mezcla que contenía 100 µl de medio DMEM sin suplementar y 3 µl de *FuGene*[®] *HD*. Tras 24 horas de transfección, lisamos las células y recogimos el sobrenadante para medir la actividad de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) y la actividad de la luciferasa de renilla (*Renilla reniformis*), que utilizamos para normalizar los valores obtenidos y corregir diferencias debidas a la eficiencia de la transfección. Debido a que ambos tipos de luciferasa presentan un origen evolutivo diferente es posible medir sus actividades simultáneamente y discriminar su actividad (Figura 32).

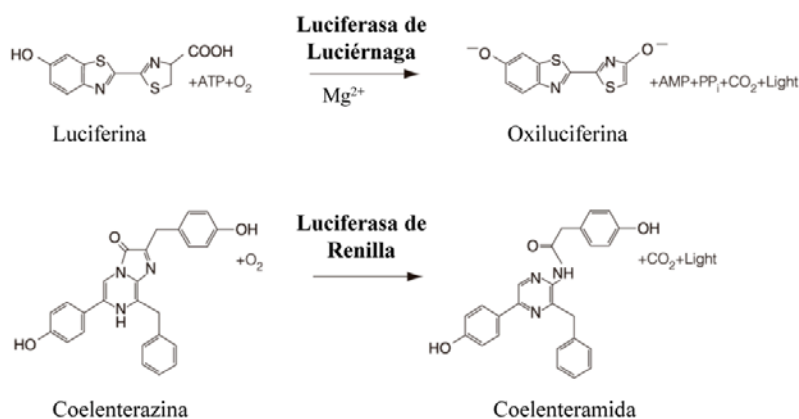


Figura 32. Reacciones de bioluminiscencia catalizadas por la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa de renilla.

La actividad luciferasa fue medida utilizando el kit *Dual-Luciferase*[®] *Reporter Assay System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold technologies). El valor real de la actividad luciferasa se obtuvo de dividir el valor obtenido de la reacción de luciferasa de luciérnaga por el valor de la reacción de la luciferasa de renilla. El ensayo se realizó por triplicado y como control negativo se utilizaron células sin transfectar.

9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

9.1. Inmunohistoquímica

Para el estudio de la expresión de las proteínas ki-67, p53, p63, VRK1, VRK2, MLH1, MSH2, MSH6, HDAC1, HDAC2 y HDAC3 por inmunohistoquímica se construyó una micromatriz de tejidos (TMA, *Tissue microarray*). Para ello, el tejido tumoral en fresco de cada uno de los pacientes fue fijado en formol durante 12-24 horas e incluido en bloques de parafina. Todos los tumores fueron revisados histológicamente y se seleccionaron tres cilindros de 1 mm de diámetro de diferentes zonas no necróticas y morfológicamente representativas de cada tumor, con el fin de asegurar la calidad, reproducibilidad y tinción homogénea de todos los casos. De esta manera se construyeron tres bloques de TMA que incluían los 105 tumores de estudio y 9 tejidos control (Figura 33).

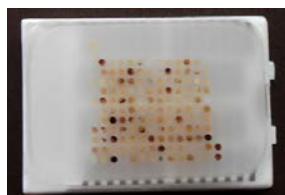


Figura 33. Imagen de una de las micromatrices de tejido (*tissue microarray*) utilizadas para el estudio de inmunohistoquímica

Se realizaron cortes de 3-4 μm a los bloques de TMA que se adhirieron a portaobjetos y se secaron durante 16 horas a 56 °C antes de ser desparafinados en xileno y rehidratados en alcoholes de gradación decreciente. La recuperación antigénica se realizó en una olla a presión durante 2 minutos utilizando citrato sódico 10 mM a pH 6.5 y la actividad de la peroxidasa endógena se neutralizó con la solución *Peroxidase Block* durante 5 minutos. Posteriormente, los portas se incubaron en la solución *Protein Block* durante 5 minutos, para reducir las posibles uniones inespecíficas, y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 hora (Tabla 22). Tras ello, se incubó con la solución *Post Primary Block*, que mejora la penetración del reactivo polimérico posterior, y se incubó con el reactivo *Polymer*, que reconoce inmunoglobulinas de ratón y de conejo y detecta todos los anticuerpos primarios ligados al tejido, durante 30 minutos. Finalmente, se reveló la actividad peroxidasa con solución de trabajo DAB (3,3'-diaminobenzidina). Todas las soluciones y reactivos

utilizados son del kit *Novolink Polymer Detection System* (Novocastra). Por último, se realizó una contratinción con Hematoxilina, se deshidrató en alcoholes de gradación creciente seguido de xilol y se montó la preparación en entellan o similar.

Se analizaron las tres secciones de cada tumor incluidas en los TMA's así como los controles de tejido para verificar que la tinción era específica. Los niveles expresión de cada proteína se analizaron de manera semicuantitativa en base a la intensidad de la tinción y al porcentaje de células positivas (Tabla 22).

Tabla 22. Relación de proteínas analizadas por inmunohistoquímica, anticuerpos primarios utilizados y criterios de positividad.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Criterio positividad	Casa Comercial
Anti-ki-67 (MIB-1)	Mouse	Prediluido	>5% tinción nuclear	Dako
Anti-p53 (DO-7)	Mouse	1:100	>50% tinción nuclear	Novocastra
Anti-p63 (4A4)	Mouse	1:25	>50% tinción nuclear	Dako
Anti-VRK1	Rabbit	1:200	>50% tinción nuclear	Producido por el Dr. P. Lazo
Anti-VRK2	Rabbit	1:200	>50% tinción citoplasmática	Producido por el Dr. P. Lazo
Anti-MLH1 (G168-15)	Mouse	1:20	>30% tinción nuclear	BD Pharmingen
Anti-MSH2 (FE11)	Mouse	Prediluido	>30% tinción nuclear	Biocare Medical
Anti-MSH6 (BC/44)	Mouse	Prediluido	>30% tinción nuclear	Biocare Medical
Anti-HDAC1 (ab7028)	Rabbit	1:300	>50% tinción nuclear	Abcam
Anti-HDAC2 (ab7029)	Rabbit	1:500	>50% tinción nuclear	Abcam
Anti-HDAC3 (ab7030)	Rabbit	1:500	>50% tinción nuclear y citoplasmática	Abcam

9.2. Electroforesis de proteínas y Western blot

Mediante esta técnica analizamos la expresión de las proteínas EGFR y PTEN. Para ello, las proteínas fueron separadas en función de su tamaño mediante electroforesis vertical en geles SDS-PAGE (*Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) siguiendo el protocolo de Laemmli (214). Se utilizaron minigeles discontinuos. El gel separador se preparó a un porcentaje de acrilamida adecuado al tamaño de las proteínas a separar (8-12% acrilamida/0.2-0.3% bis-acrilamida) en tampón 0.375 M Tris-HCl pH 8.8 y 3.5 mM SDS. Encima del gel separador, se preparó un gel concentrador al 4% acrilamida/0.1% bis acrilamida en tampón 0.125 M Tris-HCl pH 6.8 y SDS 3.5 mM. Para la polimerización de los geles se utilizó AMPS (persulfato de amonio) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina).

Las muestras de proteína se procesaron con tampón de carga (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2.3% SDS, 0.1% azul de bromofenol y 5% β -mercaptoetanol) y se desnaturalizaron durante 10 minutos a 100 °C. La electroforesis se realizó a 150 voltios en condiciones desnaturalizantes en tampón de carrera (25 mM

Tris-HCl, 200 mM Glicina y 0.05% SDS) y como marcador de peso molecular se utilizó el marcador preteñido *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas).

Una vez separadas por tamaño, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF *Immobilon-P* (Millipore) utilizando el sistema de transferencia húmeda de BioRad durante 1 hora y media a 100 voltios en tampón 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina y 20% metanol. Para verificar la eficiencia de la transferencia se tiñó la membrana con 0.1% Rojo Ponceau en 1% de ácido acético. Posteriormente, la membrana fue bloqueada durante 2 horas en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (0.1 % Tween-20 en TBS) para saturar todos los sitios inespecíficos de unión a proteínas. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés a la dilución adecuada (Tabla 23) durante 1-2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, seguido de varios lavados con TBS-T. Luego la membrana se incubó con la dilución adecuada del anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 23), conjugado con peroxidasa (HRP), durante 45 minutos-1 hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados de la membrana, para la detección de las proteínas marcadas específicamente con los anticuerpos, se utilizó el sistema de quimioluminiscencia *ECL Plus Western Blotting Detection Reagent* (Amersham Bioscience), según las especificaciones del fabricante, y se expusieron las membranas a películas fotosensibles de autorradiografía (Fujifilm).

Tabla 23. Relación de los anticuerpos para western blot utilizados en este trabajo.

	Anticuerpo	Origen	Dilución	Casa comercial
Primario	Anti-EGFR/EGFRvIII (AHR5062)	Mouse	1:2000	Invitrogen
	Anti-PTEN (sc-7974)	Mouse	1:200	Santa Cruz Biotech.
	Anti-β-actina	Mouse	1:10000	Sigma-Aldrich
Secundario	Anti-mouse	Sheep	1:5000-1:10000	Sigma-Aldrich

10. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

El análisis de la amplificación de *EGFR* y la delección de *PTEN* se llevó a cabo mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Para el análisis del número de copias de *EGFR* por núcleo se utilizó una sonda específica localizada en la región 7p12 y como sonda control se empleó DNA complementario a la región centromérica del cromosoma 7 (sondas comerciales *Vysis LSI EGFR SpectrumOrange/ CEP 7*

SpectrumGreen). De manera análoga, para el análisis del número de copias de *PTEN* se utilizó una sonda específica de la región 10q23 y como control una sonda de la región centromérica del cromosoma 10 (sondas comerciales *Vysis LSI PTEN SpectrumOrange/CEP 10 SpectrumGreen*).

La FISH se realizó sobre portas de tejido tumoral incluido en parafina de los TMA's de 3-4 μm de espesor. Los portas de tejido se desparafinaron en xileno, etanol y se secaron. Se trataron con tampón citrato pH 6.5 en una olla a presión durante 20 minutos, seguido de una digestión con proteasas durante 30 minutos para eliminar el citoplasma de las células y facilitar la detección de la señal posterior. A continuación, se realizó una desnaturalización del DNA celular y de la sonda a 75 °C durante 1 minuto y, posteriormente, los portas se incubaron a 37 °C en un termociclador (Hybrite™) durante toda la noche. El revelado de las señales se realizó a 46 °C con una solución al 50% formamida en 2xSSC seguido de un lavado en PBS-Tween. La contratinción de las células se llevó a cabo con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).

Se analizaron un mínimo de 200 núcleos en interfase en cada muestra y, en base a los resultados obtenidos al hibridar estas sondas en controles normales, el punto de corte para la identificación de las alteraciones se delimitó en >20% de células con un patrón anormal de ganancia o pérdida de las correspondientes señales de fluorescencia.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de las variables clínicas. En el caso de las variables categóricas nominales y ordinales se calculó la proporción de pacientes en cada categoría, y en las variables cuantitativas se calculó la mediana y el rango intercuartílico.

La relación entre las distintas variables clínicas y moleculares se ha analizado mediante la elaboración de tablas de contingencia y el test χ^2 de Pearson. En los casos en los que la frecuencia de alguno de los grupos fue menor del 5%, se empleó el test exacto de Fisher. Además, como análisis multivariante de las alteraciones moleculares identificadas, se llevó a cabo un biplot logístico que trabaja con variables binarias tipo “ausencia/presencia” y permite la representación simultánea de individuos y variables

en el mismo espacio. La agrupación de los pacientes se realizó mediante un análisis de cluster jerárquico aplicando el método de la media y utilizando las coordenadas generadas para cada individuo por el biplot logístico.

En los estudios de asociación de polimorfismos, se analizó la distribución de genotipos entre pacientes y controles mediante el test χ^2 de Pearson o el test de Fisher. En aquellos polimorfismos en los que encontramos diferencias estadísticamente significativas, analizamos los modelos de herencia y realizamos una regresión logística multivariante para conocer el riesgo que puede generar la presencia de un determinado genotipo. Además, se llevó a cabo un análisis de haplotipos de polimorfismos localizados próximos en el mismo cromosoma. Las frecuencias haplotípicas se estimaron mediante el algoritmo EM (*Expectation Maximization*) y la asociación de los distintos haplotipos con la enfermedad se determinó mediante una regresión logística.

Los datos obtenidos en el estudio de luciferasa se analizaron mediante el análisis de la varianza de un factor (*one-way ANOVA*) para comparar las diferencias entre los grupos.

En los análisis de supervivencia, el tiempo de supervivencia global se ha estimado como el tiempo desde el diagnóstico hasta el fallecimiento del paciente o el último seguimiento. Aquellos pacientes perdidos a lo largo del seguimiento fueron censurados. Además, los pacientes con una supervivencia inferior a 30 días se excluyeron de los estudios de supervivencia, ya que estos pacientes podrían haber fallecido por causas diferentes a la propia enfermedad. Las diferencias entre los tiempos de supervivencia se han estimado por el método Kaplan-Meier y la comparación entre grupos se ha realizado usando el test log-rank. El modelo de los riesgos proporcionales de Cox se ha utilizado para evaluar la independencia de los factores pronóstico identificados; y se ha establecido un índice pronóstico con las variables estadísticamente significativas utilizando los coeficientes de regresión del modelo de Cox de acuerdo con el procedimiento descrito en Parmar and Machin (215).

En todos los casos se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se observaron valores de P-valor < 0.05 .

El análisis biplot logístico fue realizado con el programa MultBiplot (216), los estudios de haplotipos con el programa SNPStats (217) y el resto de los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS v.18.0.

En los diferentes análisis realizados en este trabajo, los pacientes con astrocitomas anaplásicos y glioblastomas se han analizado de manera conjunta como astrocitomas de alto grado, ya que los análisis por separado no mostraron diferencias entre ambos grupos.

12. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

El análisis de la conservación interespecífica de las secuencias proteicas se llevó a cabo con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>), introduciendo las secuencias a comparar en formato FASTA. El programa ClustalW permite el alineamiento de múltiples secuencias de DNA o proteínas, permitiendo ver las similitudes o diferencias entre las secuencias alineadas.

➤ ESTUDIOS *IN SILICO* DE LA PATOGENICIDAD DE MUTACIONES

El estudio del comportamiento teórico de las mutaciones *missense* de significado desconocido no descritas previamente se llevó a cabo mediante el empleo de cuatro programas informáticos:

- PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)
- SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>)
- PMut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>)
- Panther (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*) (<http://www.pantherdb.org/>)

El estudio de simulación de la estructura secundaria de las proteínas con deleciones de aminoácidos sin cambios en la fase de lectura se realizó con el programa PSIPRED (*Protein Secondary Structure Prediction*) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

➤ PREDICCIÓN DE MICRORNAS

Para la predicción de la unión de microRNAs a la región 3' UTR de los genes en los que se han encontrado cambios se han empleado las siguientes aplicaciones bioinformáticas:

- microRNA (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)
- TargatScanHuman 6.2 (<http://www.targetscan.org/>)
- DIANA-microT v3.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>)
- MicroCosm Targets v5 (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>)

➤ BASES DE DATOS

La búsqueda de las mutaciones identificadas en este trabajo se realizó en diversas bases de datos pertenecientes a instituciones científicas, así como en publicaciones previas, con el fin de recabar información sobre su existencia, frecuencia de aparición, patogenicidad, etc.

- PubMed (*U.S. National Library of Medicine*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)
- UniProt (*Universal Protein Resource*) (<http://www.uniprot.org/>)
- HGMD (*The Human Gene Mutation Database*) (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php)
- COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>)
- LOVD (*Leiden Open Variation Database*) (http://grenada.lumc.nl/LSDB_list/lsdbs)
- IARC TP53 database (<http://p53.iarc.fr/>)
- The TP53 Web Site (<http://p53.free.fr/>)
- *Mismatch Repair Genes Variant Database* (<http://www.med.mun.ca/mmrvariants/>)

RESVLTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES MOLECULARES RELACIONADAS CON EL DESARROLLO Y LA EVOLUCIÓN DE LOS ASTROCITOMAS

Para la caracterización de las principales alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo y la evolución de los astrocitomas hemos analizado 105 pacientes: 2 astrocitomas pilocíticos, 22 astrocitomas de bajo grado, 20 astrocitomas anaplásicos y 61 glioblastomas multiformes (Tabla 24).

Tabla 24. Principales características de los pacientes de estudio, localización del tumor y tratamiento recibido.

	ABG (grado I y II) n=24	AA (grado III) n=20	GBM (grado IV) n=61
Sexo			
Hombres	14 (58.3%)	13 (65.0%)	38 (62.3%)
Mujeres	10 (41.7%)	7 (35.0%)	23 (37.7%)
Mediana de edad, años [IQR]	35 [29.3 - 46.0]	56 [46.3 - 66.0]	64 [55.0 - 69.0]
Localización del tumor			
• Por hemisferios			
Derecho	8 (33.3%)	11 (55.0%)	35 (57.4%)
Izquierdo	9 (37.5%)	5 (25.0%)	21 (34.4%)
Otra	7 (29.2%)	4 (20.0%)	5 (8.2%)
• Por lóbulos			
Temporal	7 (29.2%)	7 (35.0%)	23 (37.7%)
Frontal	7 (29.2%)	6 (30.0%)	22 (36.1%)
Parietal	3 (12.5%)	1 (5.0%)	6 (9.8%)
Occipital	0 (0.0%)	2 (10.0%)	5 (8.2%)
Otra	7 (29.2%)	4 (20.0%)	5 (8.2%)
Cirugía			
Exéresis total	14 (58.3%)	14 (70.0%)	45 (73.8%)
Exéresis subtotal	10 (41.7%)	6 (30.0%)	16 (26.2%)
Tratamiento post-quirúrgico			
No tratamiento	12 (50.0%)	4 (20.0%)	6 (9.8%)
Radioterapia	7 (29.2%)	8 (40.0%)	41 (67.2%)
Radioterapia + quimioterapia	5 (20.8%)	8 (40.0%)	14 (23.0%)
Mediana de supervivencia, meses [IC 95%]	98.9 [52.4 - 145.4]	13.0 [10.1 - 16.0]	11.5 [8.5 - 14.4]

ABG: Astrocitoma de Bajo Grado; AA: Astrocitoma Anaplásico; GBM: Glioblastoma Multiforme; IQR: Rango Intercuartílico

Como puede observarse en la tabla 24, la frecuencia de los astrocitomas es mayor en los hombres que en las mujeres. La mayor parte de los tumores se localizan en los lóbulos frontal y temporal, y tienen predilección por el hemisferio cerebral derecho. La primera línea de tratamiento en todos los casos fue la cirugía intentando la resección completa de la masa tumoral; no obstante, el 30% de los astrocitomas de bajo grado y el 50% de los de alto grado recibieron posterior tratamiento con radioterapia.

Sólo un 25% de los pacientes fueron tratados de manera concomitante o adyuvante con quimioterapia, siendo la temozolamida el fármaco de elección en el 90% de los casos. Tanto la edad de aparición como el pronóstico de los pacientes se encuentra relacionado con el grado de malignidad del tumor ($P < 0.001$).

• **Análisis de la expresión de ki-67**

Entre los criterios establecidos por la OMS para la clasificación de los astrocitomas se encuentra el nivel de actividad mitótica que se correlaciona con el grado de malignidad (6). El antígeno ki-67 es una proteína nuclear no histona que se expresa durante todas las fases del ciclo celular (G1-S-G2-M). Su función no está del todo clara, aunque sus niveles de expresión se consideran un marcador de proliferación celular y se han relacionado con el pronóstico de los pacientes (218, 219).

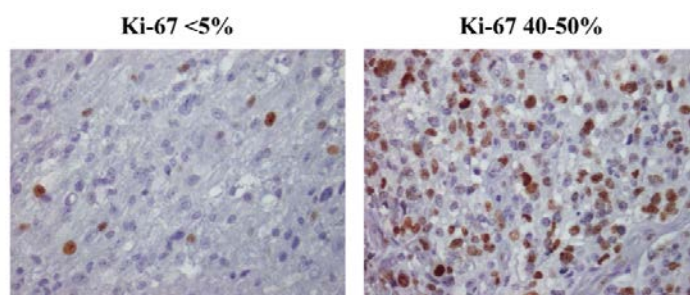


Figura 33. Imágenes de dos glioblastomas con bajo y alto índice de proliferación.

El análisis de la expresión de ki-67 mediante inmunohistoquímica (Figura 33) reveló mayores niveles de expresión al aumentar al grado de malignidad (Tabla 25). El rango de expresión varió entre 0% y 10% de células tumorales con tinción positiva en los astrocitomas de bajo grado, y entre 0% y 50% en los tumores de alto grado. Sin embargo, no encontramos ninguna relación entre la expresión de ki-67 y el pronóstico de los pacientes.

Tabla 25. Niveles de expresión del marcador ki-67 en función del grado del tumor.

	Expresión ki-67		P-valor
	<5%	>5%	
Grado de malignidad			<0.001
Astrocitomas de Bajo grado	20 (90.9%)	2 (9.1%)	
Astrocitomas de Alto grado	24 (34.8%)	45 (65.2%)	

Se han descrito múltiples vías de señalización implicadas tanto en el desarrollo como en la evolución de los astrocitomas. En nuestro trabajo hemos querido profundizar en la caracterización de las alteraciones más frecuentes que afectan a la ruta regulada por p53, a la vía de señalización de EGFR/PI3K/PTEN/RAS, así como las alteraciones en el metabolismo celular debidas a mutaciones en los genes IDH.

1.1. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN P53

El gen *TP53* es el gen más frecuentemente alterado en tumores humanos. Su inactivación se produce en la mayor parte de los casos por mutaciones *missense* que alteran la conformación y la función de la proteína, y conducen a la acumulación en el núcleo de altas concentraciones de proteína mutada (49, 65).

- **Análisis de la expresión de p53**

En primer lugar, llevamos a cabo el análisis de la expresión de la proteína p53 en los astrocitomas de bajo y alto grado mediante inmunohistoquímica (Figura 34).

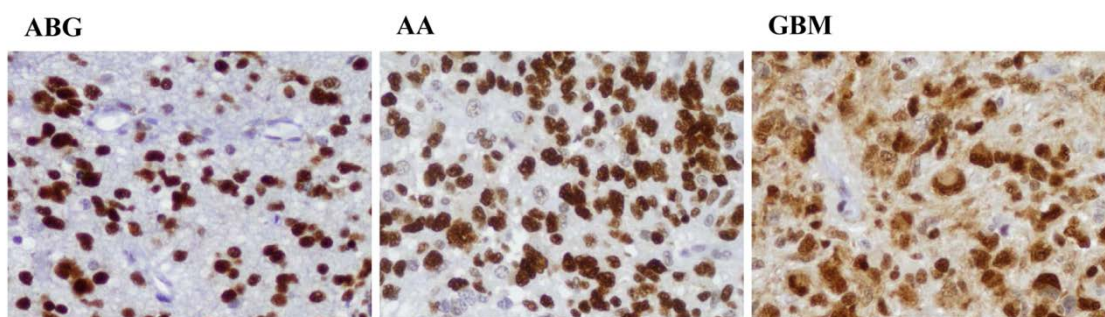
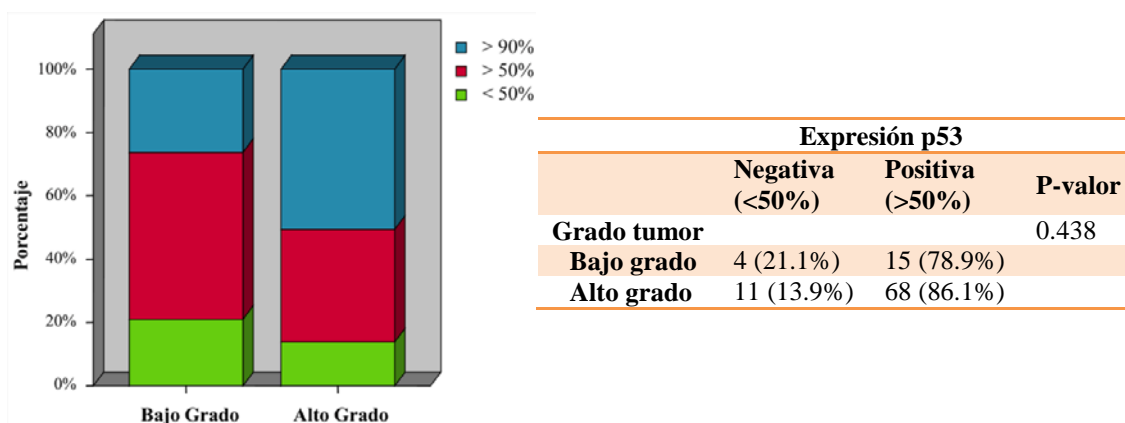


Figura 34. Imágenes representativas de casos con sobreexpresión de p53.

El 78.9% de los astrocitomas de bajo grado y el 86.1% de los astrocitomas de alto grado expresaron p53 en más del 50% de las células tumorales. Además, en el 26.3% de los tumores de bajo grado y en el 50.6% de los de alto grado se detectó una fuerte tinción nuclear en más del 90% de las células tumorales (Figura 35).

RESULTADOS



	Expresión p53		P-valor
	Negativa (<50%)	Positiva (>50%)	
Grado tumor			0.438
Bajo grado	4 (21.1%)	15 (78.9%)	
Alto grado	11 (13.9%)	68 (86.1%)	

Figura 35. Niveles de expresión de la proteína p53 en función del grado tumoral.

- **Análisis de mutaciones en el gen *TP53***

El estudio de mutaciones en el gen *TP53* se llevó a cabo mediante la secuenciación directa de los exones 4 al 10, correspondientes a la región central de unión al DNA (exones 4 al 8) y a parte del dominio de oligomerización (exones 9 y 10), que es donde se localizan más del 95% de las mutaciones de *TP53* (64, 65).

El 30.6% de los tumores presentó mutaciones en *TP53*, con una frecuencia significativamente mayor en los astrocitomas de bajo que en los de alto grado (Tabla 26). Sin embargo, no observamos ninguna relación entre los niveles de expresión de p53 y la presencia de mutaciones en el gen, independientemente del grado de malignidad del tumor (Tabla 26). Además, realizamos también un análisis de supervivencia con el fin de conocer el valor pronóstico de las alteraciones en p53 en los pacientes con astrocitomas, y no encontramos ninguna relación ni con los niveles de expresión de p53 ni con la presencia de mutaciones en el gen *TP53*.

Tabla 26. Relación de las mutaciones en el gen *TP53* con el grado del tumor y la expresión de la proteína p53.

	Mutaciones en <i>TP53</i>		P-valor
	No mutado	Mutado	
Grado del tumor			0.002
Bajo grado	10 (43.5%)	13 (56.5%)	
Alto grado	58 (77.3%)	17 (22.7%)	
Expresión p53			
Negativa (<50%)	12 (80.0%)	3 (20.0%)	0.539
Positiva (>50%)	52 (68.4%)	24 (31.6%)	

Hemos encontrado 25 mutaciones patogénicas diferentes en 30 pacientes: 21 mutaciones *missense*, 2 *nonsense*, una mutación de *splicing* (IVS6-1G>A) que modifica un sitio canónico de procesamiento y una delección (c.391_393delAAC) que no genera cambio en la fase de lectura (Tabla 27). Todas las mutaciones han sido descritas previamente y relacionadas con diferentes tipos de tumor según datos de la IARC. El análisis de las muestras de DNA de sangre periférica de los 30 pacientes confirmó el origen somático de todas las mutaciones.

Tabla 27. Mutaciones encontradas en el gen *TP53* en astrocitomas de bajo y alto grado.

Caso	Exón	Mutación	Expresión de p53
ABG	5	c.524G>A (p.Arg175His) H	>50%
ABG	6	c.578A>G (p.His193Arg) H	>90%
ABG	6	c.584T>C (p.Ile195Thr) H	>50%
ABG	6	c.614A>G (p.Tyr205Cys)	>50%
ABG	7	c.707A>G (p.Tyr236Cys)	>50%
ABG	8	c.817C>T (p.Arg273Cys) H	-
ABG	8	c.817C>T (p.Arg273Cys)	>50%
ABG	8	c.817C>T (p.Arg273Cys)	>90%
ABG	8	c.817C>T (p.Arg273Cys)	>50%
ABG	8	c.817C>T (p.Arg273Cys) H	<50%
ABG	8	c.838A>G (p.Arg280Gly)	>50%
ABG	10	c.1024C>T (p.Arg342Stop)	-
ABG	5	c.524G>A (p.Arg175His)	<50%
ABG	6	c.583A>T (p.Ile195Phe)	<50%
AA	6	c.590T>G (p.Val197Gly)	>90%
AA	7	c.742C>T (p.Arg248Trp) H	>90%
AA	10	c.1024C>T (p.Arg342Stop) H	>90%
GBM	5	c.391_393delAAC (p.Arg131delArg)	>90%
GBM	5	c.440T>A (p.Val147Asp)	>90%
GBM	5	c.466C>G (p.Arg156Gly) H	>90%
GBM	6	c.586C>T (p.Arg196Stop)	>90%
GBM	Int.6	IVS6-1G>A	<50%
GBM	7	c.711G>A (p.Met237Ile)	>50%
GBM	7	c.722C>T (p.Ser241Phe)	>90%
GBM	7	c.764T>C (p.Ile255Thr)	>90%
GBM	7	c.767C>T (p.Thr256Ile)	>90%
GBM	7	c.769C>G (p.Leu257Val)	>90%
GBM	7	c.776A>T (p.Asp259Val)	>90%
GBM	8	c.818G>A (p.Arg273His)	-
GBM	8	c.844C>T (p.Arg282Trp)	>90%
GBM	8	c.869G>A (p.Arg290His)	>50%

H: mutación en homocigosis

Sólo hemos detectado una mutación en el dominio de oligomerización, c.1024C>T (p.Arg342Stop), presente en dos pacientes. Esta mutación genera una proteína truncada que carece de la región de regulación y de parte del dominio de oligomerización, necesarios para la formación del tetrámero activo de p53. Las demás mutaciones se localizan en el dominio central de unión al DNA y generan la pérdida total o casi total de la actividad transcripcional de p53, ya que provocan modificaciones en la estructura de la proteína y/o afectan a las interacciones de p53 con el DNA y otras proteínas necesarias para su función. La mutación c.769C>G (p.Leu257Val) genera, además, un nuevo sitio de procesamiento alternativo.

Las mutaciones en el gen *TP53* no siempre equivalen únicamente a una pérdida de función, sino que además pueden tener un efecto dominante negativo sobre el alelo germinal y/o tener una ganancia de función con nuevas propiedades oncogénicas (65). Así, las mutaciones p.Arg175His, p.Tyr205Cys, p.Met237Ile, p.Arg248Trp, p.Arg273Cys y p.Arg273His poseen tanto efecto dominante negativo como ganancia de función, las mutaciones p.His193Arg y p.Ser241Phe presentan solamente efecto dominante negativo, y la mutación p.Arg282Trp posee ganancia de nuevas funciones oncogénicas (Tabla 27).

El 33.3% de las mutaciones se localizan en los puntos calientes de la proteína (codones 175, 248, 273 y 282) (65, 220). Las mutaciones en estas posiciones son mucho más frecuentes en los tumores de bajo grado (53.8%) que en los de alto grado (17.6%) (P = 0.056). Además, el 77.4% de las mutaciones fueron transiciones, el 50% de las cuales se localizaron en islas CpG repartidas a lo largo del gen.

La pérdida de función de un gen supresor tumoral puede tener lugar por la inactivación de un alelo por mutaciones patogénicas y la delección del otro alelo, generando una pérdida de heterocigosidad en el tumor. En los 8 tumores portadores de mutaciones homocigotas en *TP53* (Tabla 27), estudiamos si existía pérdida de heterocigosidad mediante el análisis de 4 polimorfismos del gen *TP53* tanto en la muestra de DNA de sangre periférica como la de tumor de cada paciente. El resultado en 7 de los 8 casos no fue informativo ya que todos los polimorfismos analizados fueron homocigotos; sin embargo, en el astrocitoma anaplásico portador de la mutación c.742C>T (p.Arg248Trp) observamos que los polimorfismos Arg72Pro e IVS7+75C>T

perdían la heterocigosidad en la muestra tumoral indicando la pérdida de un alelo (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis de los polimorfismos IVS3-54ins16pb, Arg72Pro, IVS6+62A>G y IVS7+72C>T en los pacientes con mutaciones homocigotas en *TP53*.

CASO	Muestra	IVS3-54ins16pb	Arg72Pro	IVS6+62A>G	IVS7+72C>T	
ABG	c.524G>A	SP	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
	(p.Arg175His)	Tumor	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
ABG	c.578A>G	SP	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
	(p.His193Arg)	Tumor	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
ABG	c.584T>C	SP	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
	(p.Ile195Thr)	Tumor	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
ABG	c.817C>T	SP	No ins/No ins	Pro/Pro	A/A	C/C
	(p.Arg273Cys)	Tumor	No ins/No ins	Pro/Pro	A/A	C/C
ABG	c.817C>T	SP	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
	(p.Arg273Cys)	Tumor	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
AA	c.742C>T	SP	No ins/No ins	Arg/Pro	G/G	C/T
	(p.Arg248Trp)	Tumor	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
AA	c.1024C>T	SP	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
	(p.Arg342Stop)	Tumor	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
GBM	c.466C>G	SP	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C
	(p.Arg156Gly)	Tumor	No ins/No ins	Arg/Arg	G/G	C/C

SP: sangre periférica

En los 7 tumores no informativos llevamos a cabo el estudio de la pérdida de heterocigosidad mediante PCR cuantitativa a tiempo real comparando la muestra de DNA de sangre periférica y de tejido tumoral de cada paciente. Únicamente observamos la pérdida de un alelo en el astrocitoma anaplásico que presentó la mutación c.1024C>T (p.Arg342Stop) (Figura 36). En el resto de los casos, por tanto, ambas copias del gen eran portadoras de la mutación.

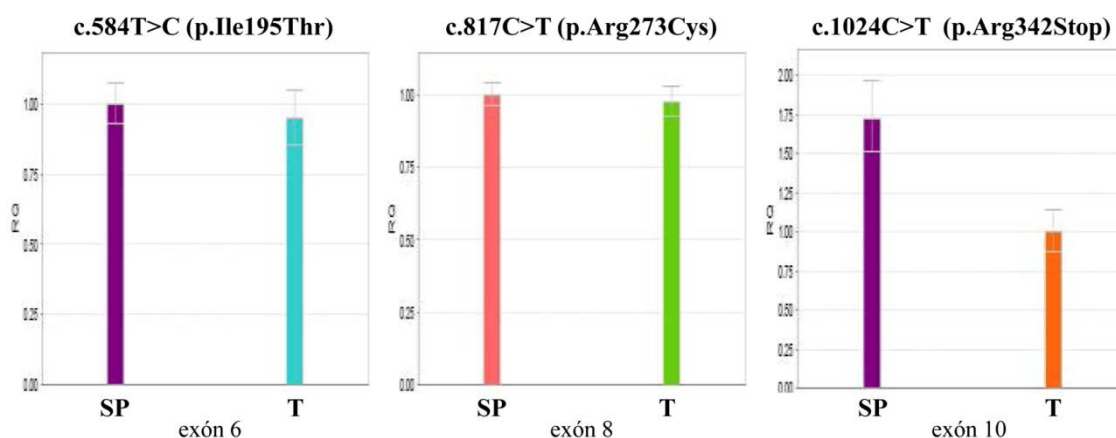


Figura 36. Gráficos del análisis de 3 de los 7 casos con mutaciones homocigotas en el gen *TP53* estudiados por PCR cuantitativa (SP: muestra de DNA de sangre periférica, T: muestra de DNA tumoral).

Además, hemos encontrado un astrocitoma de bajo grado con dos mutaciones en heterocigosis: c.524G>A (p.Arg175His) en el exón 5 y c.583A>T (p.Ile195Phe) en el exón 6. Realizamos el estudio de la pertenencia alélica de las mutaciones mediante la amplificación conjunta de los exones 5 y 6, y la clonación del producto de PCR en el vector pGEMT-Easy que nos permite separar los dos alelos del gen. Observamos que las dos mutaciones se encuentran en diferentes alelos anulando la función de las dos copias de p53.

- **Análisis del polimorfismo del codón 72 de *TP53* (rs1042522)**

Por último, analizamos la distribución genotípica del polimorfismo c.215G>C (p.Arg72Pro) que se localiza en la región rica de prolina de p53 y es importante para sus funciones apoptóticas. El estudio poblacional de este polimorfismo lo realizamos en un grupo más grande de pacientes (36 astrocitomas de bajo grado, 38 astrocitomas anaplásicos y 115 glioblastomas) cuyas características se detallan en el apartado 2 de los resultados de este trabajo (Tabla 51). Como población control analizamos 200 individuos mayores de 60 años sin historia personal ni familiar de cáncer.

Tabla 29. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.215G>C (p.Arg72Pro) del gen *TP53* en los grupos de pacientes y el grupo control.

c.215G>C (p.Arg72Pro)				
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	P-valor
ABG	22 (61.1%)	8 (22.2%)	6 (16.7%)	0.028
AA	24 (63.2%)	13 (34.2%)	1 (2.6%)	0.701
GBM	75 (65.2%)	32 (27.8%)	8 (7.0%)	0.282
Controles	116 (58.0%)	73 (36.5%)	11 (5.5%)	

El análisis mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de los astrocitomas de bajo grado y el grupo control; sin embargo, no observamos diferencias en la distribución de genotipos en los astrocitomas anaplásicos y los glioblastomas (Tabla 29).

La frecuencia de homocigotos Pro/Pro fue significativamente mayor en los pacientes con astrocitomas de bajo grado que en el grupo control (OR = 3.51 (1.18 - 10.37); P = 0.023) (Tabla 30). Estos resultados indican que el ser portador de dos

copias del alelo prolina podría conferir un mayor riesgo de desarrollar astrocitomas de bajo grado.

Tabla 30. Análisis del riesgo del polimorfismo c.215G>C (p.Arg72Pro) en astrocitomas de bajo grado en función del modelo de herencia.

		Controles	ABG	OR	IC 95%	P-valor*
Codominante	Arg/Arg	116 (58.0%)	22 (61.1%)	1.0		
	Arg/Pro	73 (36.5%)	8 (22.2%)	0.58	0.25-1.37	0.215
	Pro/Pro	11 (5.5%)	6 (16.7%)	2.91	0.96-8.89	0.060
Dominante	Arg/Arg	116 (58.0%)	22 (61.1%)	1.0		
	Arg/Pro+Pro/Pro	84 (42.0%)	14 (38.9%)	0.87	0.42-1.81	0.715
Recesivo	Arg/Arg+Arg/Pro	189 (94.5%)	30 (83.3%)	1.0		
	Pro/Pro	11 (5.5%)	6 (16.7%)	3.51	1.18-10.37	0.023

*regresión logística multivariante del genotipo ajustada en función del sexo.

Por otro lado, no encontramos ninguna relación entre la distribución de genotipos del codón 72 y la presencia de mutaciones o los niveles de expresión de p53, independientemente del grado de malignidad del tumor.

1.2. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN P63

El gen *p63* participa en la regulación de múltiples procesos celulares como la supervivencia y la proliferación, y la sobreexpresión de la proteína p63 se ha relacionado con la progresión de diversos tipos de cáncer (72).

El análisis de la expresión de p63 mediante inmunohistoquímica mostró que el 65.0% de los astrocitomas presentaban sobreexpresión de p63 (Figura 37).

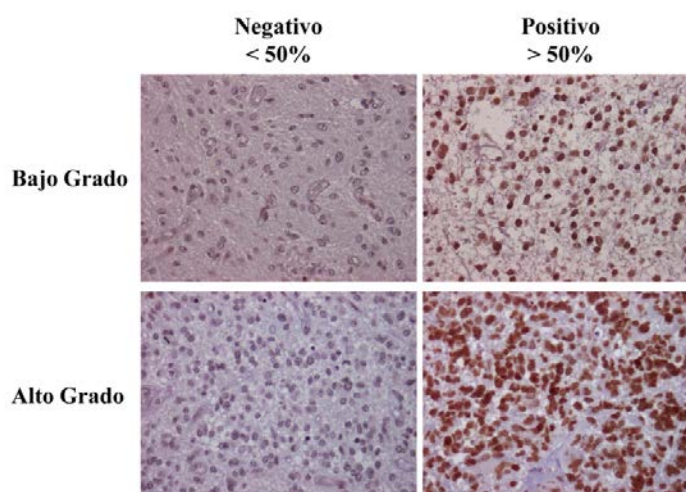


Figura 37. Imágenes representativas de tumores de bajo y alto grado con bajos y altos niveles de expresión de p63.

Los niveles de expresión de p63 están asociados significativamente con el grado de malignidad del tumor. Casi el 75% de los astrocitomas de alto grado presentaron sobreexpresión de p63, mientras que sólo un 35% de los tumores de bajo grado expresaron altos niveles de p63 (Tabla 31). Sin embargo, no encontramos ninguna relación entre los niveles de expresión de p63 y el pronóstico de los pacientes.

Tabla 31. Relación de los niveles de expresión de p63 con el grado del tumor.

	Expresión p63		P-valor
	Negativa (<50%)	Positiva (>50%)	
Astrocitomas de Bajo grado	15 (65.2%)	8 (34.8%)	0.001
Astrocitomas de Alto grado	21 (26.2%)	59 (73.8%)	

1.3. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN VRKs

Las proteínas VRKs son quinasas implicadas en la progresión tumoral y en el pronóstico de diversos tipos de cáncer. Valoramos mediante inmunohistoquímica la expresión de VRK1 (principalmente nuclear) y de VRK2 (mayoritariamente citoplasmática) en los astrocitomas de bajo y alto grado (Figura 38).

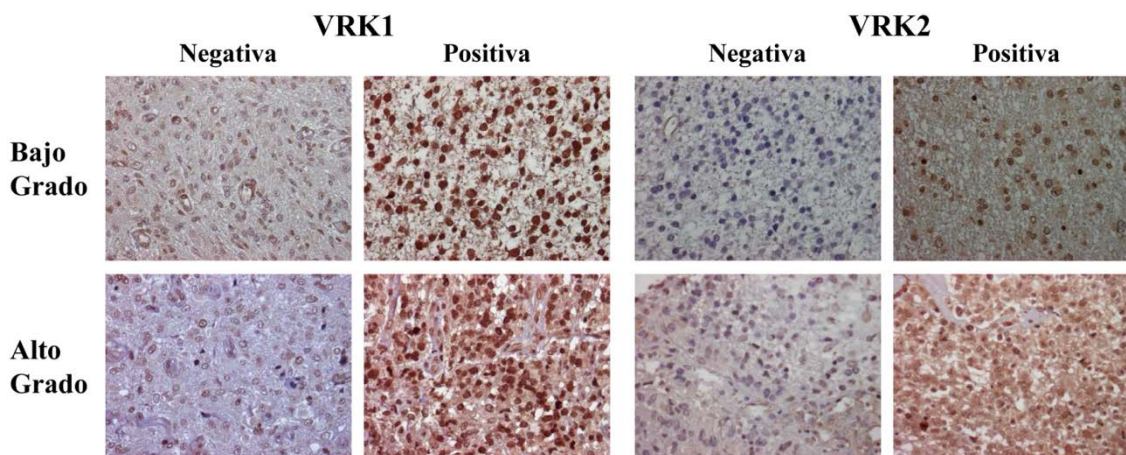


Figura 38. Imágenes representativas de tumores de bajo y alto grado con bajos y altos niveles de expresión de VRK1 y VRK2.

No encontramos ninguna relación entre los niveles de VRK1 y el grado de malignidad de los astrocitomas; sin embargo, VRK2 mostró mayores niveles de expresión en los pacientes con tumores de alto grado (Tabla 32).

Tabla 32. Relación de la expresión de las quinasas VRK con el tipo de tumor.

	Astrocitomas de Bajo grado	Astrocitomas de Alto grado	P-valor
Expresión VRK1			0.146
Negativa (<50%)	15 (62.5%)	36 (45.6%)	
Positiva (>50%)	9 (37.5%)	43 (54.4%)	
Expresión VRK2			0.021
Negativa (<50%)	14 (58.3%)	25 (32.1%)	
Positiva (>50%)	10 (41.7%)	53 (67.9%)	

Dado que VRK1 y VRK2 interactúan con p53 y existe un mecanismo de regulación entre ellos, analizamos la posible relación entre la expresión de las VRKs y los niveles de expresión y mutaciones en *TP53*, sin encontrar ningún tipo de asociación (Tabla 33).

Tabla 33. Relación de los niveles de expresión de VRK1y VRK2 con la expresión de p53 y mutaciones en *TP53*.

	Expresión VRK1			Expresión VRK2		
	Negativa (<50%)	Positiva (>50%)	P-valor	Negativa (<50%)	Positiva (>50%)	P-valor
Expresión p53			0.618			0.440
Negativa (<50%)	8 (17.4%)	7 (13.7%)		4 (11.8%)	11 (11.7%)	
Positiva (>50%)	38 (82.6%)	44 (86.3%)		30 (88.2%)	51 (82.3%)	
Mutación <i>TP53</i>			0.443			0.408
No mutado	35 (74.5%)	33 (67.3%)		25 (65.8%)	42 (73.7%)	
Mutado	12 (25.5%)	16 (32.7%)		13 (34.2%)	15 (26.3%)	

La expresión tanto de VRK1 como de VRK2 han sido relacionadas con la tasa de proliferación celular en diversos tumores. El análisis de la expresión de las VRKs con el marcador de proliferación celular ki-67 mostró una asociación estadísticamente significativa únicamente entre ki-67 y VRK2 en el grupo de los astrocitomas de alto grado (Tabla 34). En los astrocitomas de bajo grado no se pudo valorar la relación entre la expresión de las VRKs y el marcador ki-67, ya que sólo dos tumores de bajo grado mostraron expresión de ki-67 en más del 5% de las células tumorales.

Tabla 34. Relación de los niveles de expresión de VRK1 y VRK2 con el marcador de proliferación celular ki-67 en los astrocitomas de alto grado.

ALTO GRADO	Expresión ki-67		P-valor
	<5%	>5%	
Expresión VRK1			0.146
Negativa (<50%)	14 (43.8%)	18 (56.2%)	
Positiva (>50%)	10 (27.0%)	27 (73.0%)	
Expresión VRK2			0.001
Negativa (<50%)	12 (63.2%)	7 (36.8%)	
Positiva (>50%)	11 (22.4%)	38 (77.6%)	

También encontramos una asociación entre los niveles de VRK1 y la expresión de p63, relacionada con una mayor proliferación celular, tanto en los astrocitomas de bajo grado como en los de alto grado, pero no entre la expresión de VRK2 y la de p63 (Tabla 35).

Tabla 35. Relación de los niveles de expresión de VRK1 y VRK2 con la expresión de p63 en **A)** los astrocitomas de bajo grado y **B)** los astrocitomas de alto grado.

A) BAJO GRADO	Expresión p63		P-valor
	Negativa (<50%)	Positiva (>50%)	
Expresión VRK1			0.023
Negativa (<50%)	12 (85.7)	2 (14.3%)	
Positiva (>50%)	3 (33.3%)	6 (66.7%)	
Expresión VRK2			0.221
Negativa (<50%)	10 (76.9%)	3 (23.1%)	
Positiva (>50%)	5 (50.0%)	5 (50.0%)	

B) ALTO GRADO	Expresión p63		P-valor
	Negativa (<50%)	Positiva (>50%)	
Expresión VRK1			0.001
Negativa (<50%)	16 (43.2%)	21 (56.8%)	
Positiva (>50%)	5 (11.6%)	38 (88.4%)	
Expresión VRK2			0.883
Negativa (<50%)	7 (28.0%)	18 (72.0%)	
Positiva (>50%)	14 (26.4%)	39 (73.6%)	

Por último, analizamos la implicación de la expresión de las proteínas VRKs en el pronóstico de los pacientes con astrocitoma. El análisis de supervivencia reveló que los pacientes con astrocitomas de alto grado que mostraron altos niveles de expresión de VRK2 tuvieron un mejor pronóstico (13.7 meses vs. 9.8 meses; HR = 1.86 (1.11 - 3.10); P = 0.016). En el caso de los tumores de bajo grado, también se observa una ventaja en la supervivencia, aunque los resultados no fueron significativos probablemente debido al tamaño de muestra de este grupo de pacientes (Figura 39).

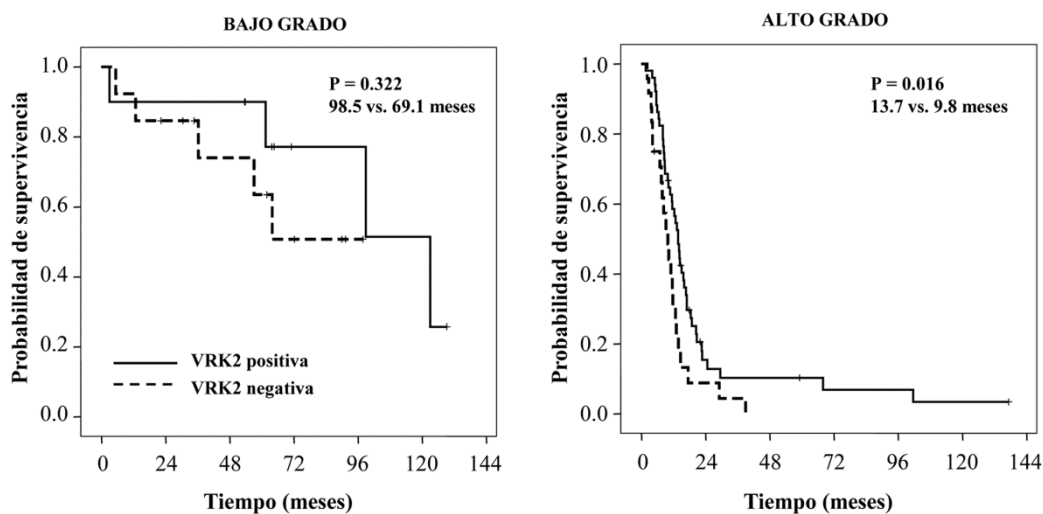


Figura 39. Curvas de supervivencia en función de la expresión de VRK2 en los pacientes con astrocitomas de bajo y alto grado.

1.4. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN EGFR

El receptor EGFR interviene en la activación de diversas rutas de señalización implicadas en el control de la proliferación y la migración celular, la apoptosis o la angiogénesis, y se encuentra amplificado y/o mutado en un gran número de tumores (93, 95).

- **Análisis de la amplificación del locus de *EGFR***

El análisis de la amplificación del locus 7p12, donde se localiza *EGFR*, mediante la técnica de FISH en cortes de parafina, mostró que el 35.1% de los astrocitomas de alto grado presentaron la amplificación de *EGFR*, mientras que en ningún astrocitoma de bajo grado detectamos la amplificación del gen (Tabla 36).

Tabla 36. Resultados del análisis de la amplificación del locus 7p12 por FISH en astrocitomas de bajo y alto grado.

	Amplificación <i>EGFR</i>		P-valor
	Amplificación	No amplificación	
Astrocitomas de Bajo Grado	0 (0.0%)	19 (100%)	0.002
Astrocitomas de Alto Grado	26 (35.1%)	48 (64.9%)	

• **Análisis de mutaciones en el dominio extracelular de *EGFR***

La principal mutación que afecta al dominio extracelular de *EGFR* es la deleción de los exones 2 al 7, correspondientes a los dominios extracelulares I y II, que genera la variante truncada EGFRvIII con actividad tirosina quinasa constitutiva. El análisis de la expresión de la forma EGFRvIII se realizó tanto por RT-PCR como por Western-blot (Figura 40).

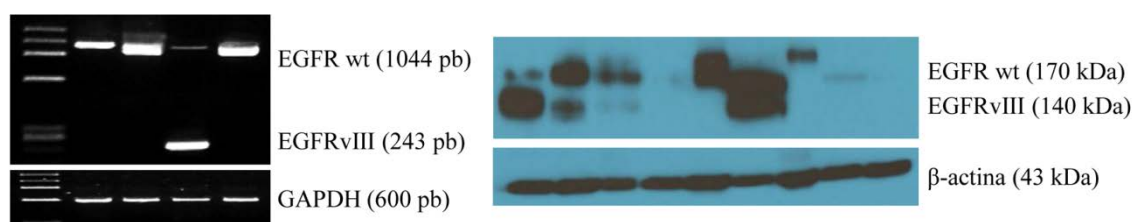


Figura 40. Análisis de la expresión de EGFRvIII mediante RT-PCR y Western blot.

El 26.1% de los tumores expresaron EGFRvIII, siendo significativamente más frecuente en tumores de alto grado (Tabla 37). En el 79.2% de los casos (19 de 24) se observó también expresión de EGFR germinal (wt, *wild-type*), mientras que en el 20.8% de los casos (5 de 24) sólo se detectó la expresión de EGFRvIII. Además, en el 27.2% de los tumores (el 39.1% de los astrocitomas de bajo grado y el 23.2% de los de alto grado) no detectamos expresión ni de EGFR germinal ni de EGFRvIII.

Tabla 37. Expresión de EGFRvIII en función del grado tumoral.

	Expresión EGFRvIII		P-valor
	EGFRvIII	No EGFRvIII	
Astrocitomas de Bajo Grado	1 (4.3%)	22 (95.7%)	0.006
Astrocitomas de Alto Grado	23 (33.3%)	46 (66.7%)	

La expresión de EGFRvIII se encuentra significativamente asociada con la amplificación del locus 7p12, el 50.0% de los tumores que expresaron EGFRvIII mostraron amplificación del receptor (Tabla 38).

Tabla 38. Relación entre la expresión de EGFRvIII y la amplificación de *EGFR*.

	EGFRvIII	No EGFRvIII	P-valor
No amplificación <i>EGFR</i>	12 (21.1%)	45 (78.9%)	0.009
Amplificación <i>EGFR</i>	12 (50.0%)	12 (50.0%)	

Además, observamos que los pacientes de alto grado con expresión de EGFRvIII presentaron mejor pronóstico (16.9 meses vs. 11.5 meses; HR = 1.96 (1.11 - 3.47); P = 0.019) (Figura 41). No pudimos analizar la relación con el pronóstico en el grupo de pacientes de bajo grado ya que sólo un tumor expresó EGFRvIII.

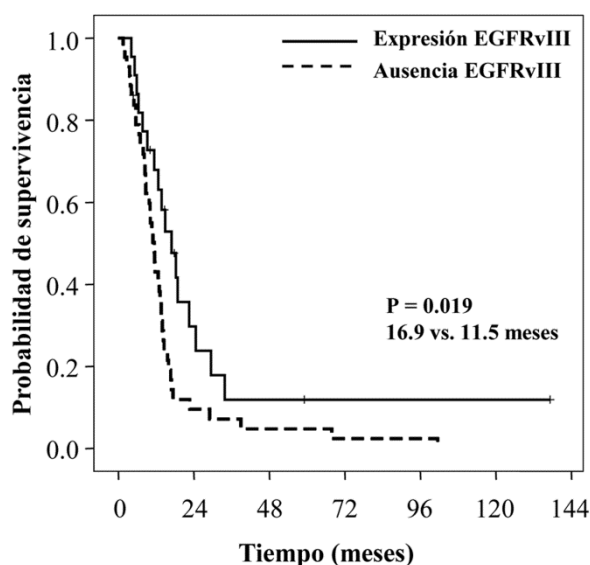


Figura 41. Curvas de supervivencia en función de la expresión de EGFRvIII en los pacientes con astrocitomas de alto grado.

En el análisis de la expresión de la variante EGFRvIII mediante RT-PCR, hemos detectado de forma casual la expresión de seis transcritos generados por procesamiento alternativo de los exones de *EGFR* en dos astrocitomas anaplásicos y cuatro glioblastomas (Figura 42). Cuatro de ellos eran codificantes, mientras que los otros dos generaban un codón de parada prematuro en los exones 2 y 3, y no han sido incluidos en este trabajo.

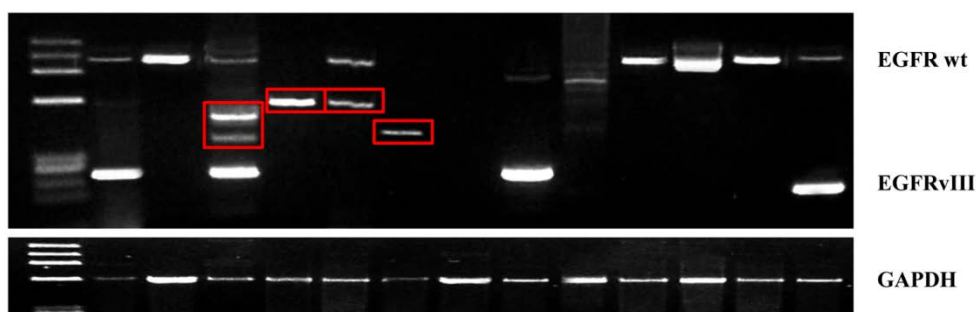


Figura 42. Análisis de la expresión de EGFRvIII. Se observan diferentes muestras con expresión de EGFR germinal (wt), EGFRvIII y otros transcritos de tamaño intermedio.

La forma EGFR_A parece utilizar un sitio de procesamiento alternativo no canónico (TCTGCC), localizado en la mitad el exón 1 y al principio del exón 7, provocando la pérdida de la región intermedia. La forma EGFR_B presenta la delección de los exones 2 al 5, la forma EGFR_C pierde los exones 3 al 6, mientras que la forma EGFR_D pierde los exones 3, 4 y 6 de *EGFR* (Figura 43). Los cuatro transcritos mantienen la fase de lectura de la proteína, excepto la forma EGFR_D en la que se modifica la lectura a lo largo del exón 5 pero se recupera de nuevo en el exón 7. En los cuatro casos se detectó también la expresión de EGFR germinal y el tumor que presentó la forma EGFR_B mostró además la expresión de EGFRvIII.

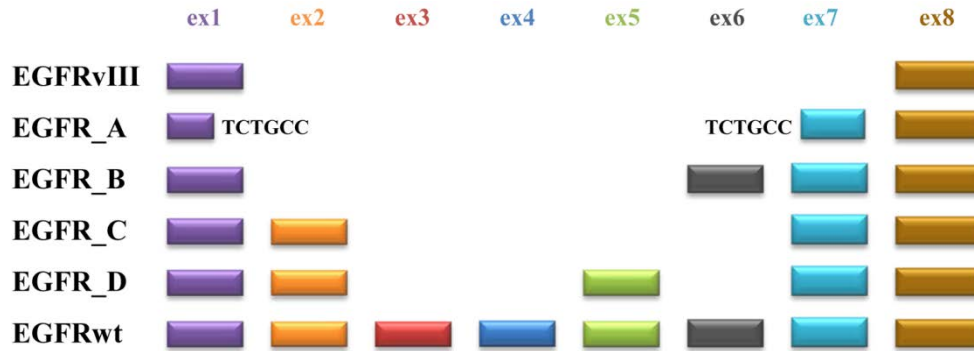


Figura 43. Esquema de los exones 1 a 9 de las isoformas de EGFR encontradas.

Estas nuevas formas descritas presentan una elevada homología con la variante EGFRvIII en los exones 1 al 9 de la región extracelular (Figura 44).

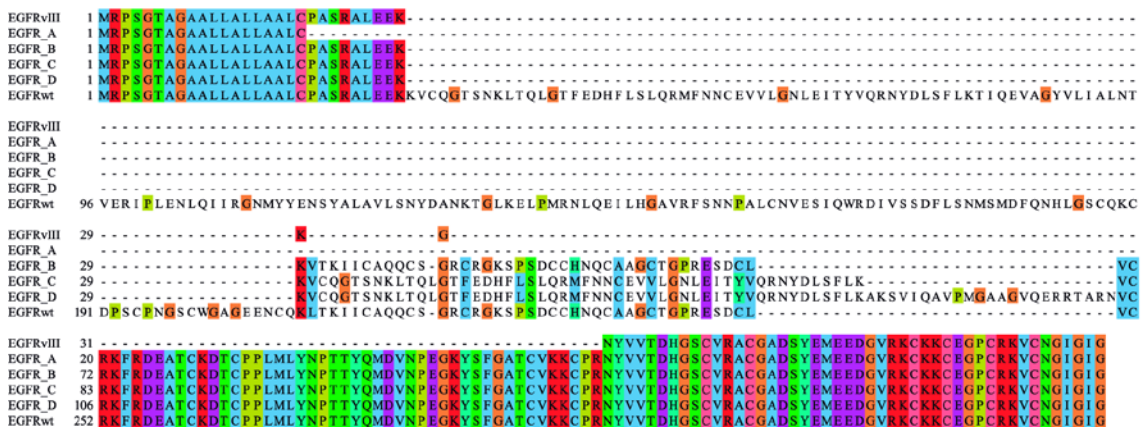


Figura 44. Alineamiento de las secuencias de proteína correspondientes a los exones 1 al 9 de las nuevas isoformas con EGFRvIII y EGFR germinal (wt).

Desconocemos la secuencia de la región central y carboxilo terminal de los transcritos, ya que no logramos la amplificación completa del cDNA debido a la baja calidad del RNA de las muestras tumorales y el gran tamaño del cDNA de EGFR. Tampoco pudimos analizar su expresión mediante Western blot, ya que sólo disponíamos del extracto proteico del tumor que presentaba las formas EGFR_B y EGFRvIII que, en teoría, tienen un tamaño molecular similar.

Con el objetivo de caracterizar mejor estos nuevos transcritos, analizamos mediante RT-PCR los exones 1 al 9 de *EGFR* en diferentes líneas celulares de glioblastoma, mama, colon, endometrio, pulmón, mieloma y hepatoma, y en dos muestras de hígado sano. A parte de la expresión de EGFR germinal y de EGFRvIII en algunos casos, detectamos la expresión de un transcrito que carecía de los exones 2, 3 y 4 sin modificar la fase de lectura de la proteína, generando a una nueva isoforma en el dominio extracelular, en las dos muestras de hígado.

- **Análisis de mutaciones en el dominio tirosina quinasa de *EGFR***

El análisis de mutaciones en el dominio tirosina quinasa del gen *EGFR*, así como el estudio de mutaciones en los genes *PI3KCA* y *PTEN* que se detallan en los siguientes apartados, sólo se llevó a cabo en los astrocitomas de alto grado ya que en los astrocitomas de bajo grado, en general, no tienen lugar mutaciones en estos genes (16, 19).

El análisis mediante PCR y secuenciación automática los exones 18 al 21 del gen *EGFR*, que se corresponden con el dominio tirosina quinasa, no mostró ninguna mutación en los astrocitomas de alto grado.

1.5. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN *PI3KCA*

EL oncogén *PI3KCA* se encuentra mutado en muchos tumores provocando la activación constante de la ruta de proliferación y supervivencia celular PI3K/PTEN/AKT. Las mutaciones en *PI3KCA* no se encuentran distribuidas aleatoriamente, sino que se concentran en los dominios helicasa (exón 9) y quinasa (exón 20), y con menor frecuencia en el dominio C2 (exón 7) (102, 108).

El análisis de los exones 7, 9 y 20 mediante PCR y CSGE-heterodúplex en los astrocitomas de alto grado mostró 5 mutaciones en 2 astrocitomas anaplásicos y 3 glioblastomas (Tabla 39).

Tabla 39. Mutaciones encontradas en el gen *PI3KCA* en astrocitomas de alto grado.

Caso	Exón	Mutación	Dominio	Función	Bibliografía
AA	9	c.1634A>G (p.Glu545Gly)	Helicasa	Patogénica	Descrita
AA	9	c.1637A>G (p.Gln546Arg)	Helicasa	Patogénica	Descrita
GBM	7	c.1345C>T (p.Pro449Ser)	C2	Desconocida	No descrita
GBM	9	c.1637A>C (p.Gln546Pro)	Helicasa	Patogénica	Descrita
GBM	20	c.3139C>T (p.His1047Tyr)	Quinasa	Patogénica	Descrita

Todas fueron mutaciones *missense* somáticas, presentes en heterocigosis en el DNA tumoral y ausentes en las muestras de DNA de sangre periférica de los pacientes. Cuatro de las 5 mutaciones estaban descritas previamente en la bibliografía y se localizan en los puntos calientes de los dominios helicasa y quinasa, generando una ganancia de la función enzimática de PI3KCA (102).

Realizamos el estudio *in silico* de la mutación c.1345C>T (p.Pro449Ser) de significado desconocido para predecir su efecto. El estudio de conservación interespecies mostró que el aminoácido prolina está conservado a lo largo de la evolución (Figura 45), aunque únicamente dos de los cuatro programas de predicción utilizados consideran que la variante es patogénica (Tabla 40). Sin embargo, en esta misma posición, se ha descrito en diversas bases de datos que el cambio p.Pro449Thr es patogénico, por lo que posiblemente la sustitución prolina por serina también lo sea.

Tabla 40. Comportamiento teórico de la mutación c.1345C>T (p.Pro449Ser) del gen *PI3KCA*.

Mutación	Polyphen	Score	PMut	Score	SIFT	Score	Panther	Score
c.1345C>T (p.Pro449Ser)	Probablemente patogénica	1.00	Neutral	0.11	Tolerada	0.53	Deletérea	-4.00

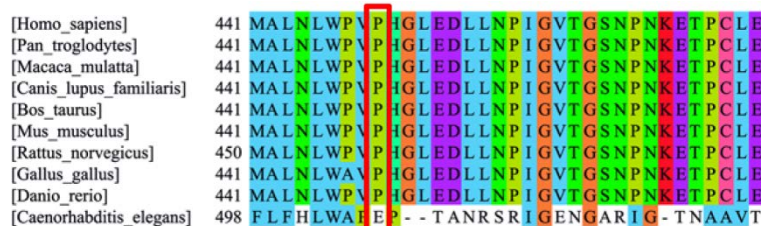


Figura 45. Comparación de la secuencia de la proteína PI3KCA entre diferentes especies en la zona del cambio p.Pro449Ser.

Además, encontramos un polimorfismo muy poco frecuente en la región 3' UTR del gen *PI3KCA*, c.*29T>C (rs141178472). Dado que esta región es importante para la estabilidad del mRNA y para su regulación por microRNAs, analizamos *in silico* los microRNAs que podrían verse afectados por el cambio de nucleótido. Solamente identificamos un microRNA que interaccionaría con la posición +29 de la región 3' UTR de *PI3KCA*, hsa-miR-525-5p (Figura 46), cuya unión podría verse modificada por el cambio, aunque serían necesarios estudios funcionales para confirmar esta hipótesis.

```

Secuencia hsa-miR-525-5p   UCUUUCACGU---AGGGAGACCUc
                             ||||| || |  || |||||
Secuencia 3'UTR PIK3CA     AGAAAATGAAAGCTCACTCTGGAT
    
```

Figura 46. Representación del anillamiento entre el microRNA hsa-miR-252-5p y la región 3' UTR de *PI3KCA*. En verde se muestra la localización del polimorfismo c.*29T>C.

1.6. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN PTEN

El gen supresor tumoral *PTEN* se encuentra inactivado por múltiples mecanismos entre los que se encuentran la delección homo o hemicigota del cromosoma 10 o del locus 10q23, y las mutaciones inactivantes distribuidas a lo largo de todo el gen. La pérdida de función de *PTEN* genera una activación de AKT similar a la producida por las mutaciones oncogénicas en *PI3KCA* (100, 113).

- **Análisis de la delección del locus de *PTEN***

El estudio del locus 10q23, donde se localiza *PTEN*, mediante la técnica de FISH sobre tejido parafinado en los astrocitomas de bajo y alto grado, mostró que el 68.8% de los tumores presentaban pérdida de la región 10q23. El número de tumores de alto grado con delección de *PTEN* fue significativamente mayor (Tabla 41).

Tabla 41. Resultados del análisis de la delección del locus 10q23 por FISH en astrocitomas de bajo y alto grado.

	Delección <i>PTEN</i>		P-valor
	Delección	No delección	
Astrocitomas de Bajo Grado	4 (33.3%)	8 (66.7%)	0.007
Astrocitomas de Alto Grado	49 (75.4%)	16 (24.6%)	

En aquellos casos en los que existía delección del locus de *PTEN*, el porcentaje medio de células tumorales con delección fue del 52.1% (rango 20-86%), sin diferencias entre los astrocitomas de bajo grado y alto grado.

- **Análisis de la expresión de PTEN**

El análisis de la expresión de PTEN se llevó a cabo mediante Western blot en los mismos tumores (Figura 47).

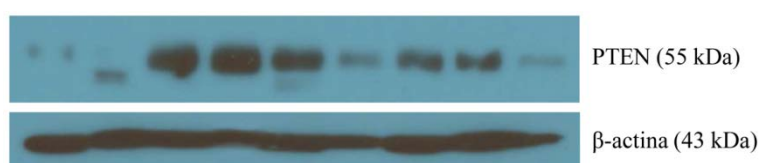


Figura 47. Análisis de la expresión de PTEN mediante Western blot.

El 20% de los tumores presentaron una disminución o una pérdida total de la expresión de la proteína, sin diferencias entre los astrocitomas de bajo y alto grado; sin embargo, observamos que la ausencia de expresión de la proteína PTEN fue más frecuente en los tumores con delección de *PTEN*, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas (Tabla 42).

Tabla 42. Resultados del análisis de la expresión de PTEN en función del grado de malignidad del tumor y de la delección de *PTEN*.

	Expresión de PTEN		P-valor
	Normal	Disminuida/Perdida	
Grado de Malignidad			0.492
Astrocitomas de Bajo Grado	14 (87.5%)	2 (12.5%)	
Astrocitomas de Alto Grado	38 (77.6%)	11 (22.4%)	
Delección <i>PTEN</i> (locus 10q23)			0.065
No delección <i>PTEN</i>	17 (94.4%)	1 (5.6%)	
Delección <i>PTEN</i>	20 (69.0%)	9 (31.0%)	

- **Análisis de mutaciones en el gen *PTEN***

El análisis de mutaciones en el gen *PTEN* se llevó a cabo mediante PCR y CSGE-heterodúplex en los exones 1 al 4, y mediante PCR y secuenciación directa en los exones 5 al 9, donde la mayor parte de las mutaciones descritas son transiciones. El

estudio se realizó únicamente en los astrocitomas de alto grado y mostró 21 mutaciones distintas en 19 pacientes (25.3%) (Tabla 43).

Tabla 43. Mutaciones encontradas en el gen *PTEN* en los astrocitomas de alto grado.

Caso	Exón	Mutación	Dominio	Bibliografía	Función	Expresión PTEN
AA	7	c.741_742insA (p.Pro248ThrfsX5)	C2	Descrita	Patogénica	-
AA	8	c.827A>G (p.Asn276Ser)	C2	Descrita	Patogénica	SI
GBM	1	c.59G>C (p.Gly20Ala)	Fosfatasa	No descrita	Desconocida	SI
GBM	Int.2	IVS2-1G>A	Fosfatasa	No descrita	Desconocida	SI
GBM	3	c.198G>T (p.Lys66Asn) H	Fosfatasa	Descrita	Patogénica	SI
GBM	5	c.264T>G (p.Tyr88Stop)	Fosfatasa	No descrita	Patogénica	-
GBM	5	c.388C>T (p.Arg130Stop) H	Fosfatasa	Descrita	Patogénica	-
GBM	5	c.451G>C (p.Ala151Pro)	Fosfatasa	No descrita	Desconocida	SI
	5	c.428G>A (p.Gly143Asp)	Fosfatasa	Descrita	Patogénica	
GBM	5	c.491_492insA (p.Lys164LysfsX16)	Fosfatasa	Descrita	Patogénica	-
	7	c.783G>T (p.Gln261His)	C2	No descrita	Desconocida	
GBM	6	c.493G>A (p.Gly165Arg)	Fosfatasa	Descrita	Patogénica	SI
GBM	6	c.521A>G (p.Tyr174Cys) H	Fosfatasa	No descrita	Desconocida	Disminuida
GBM	7	c.655C>T (p.Gln219Stop)	C2	Descrita	Patogénica	NO
GBM	8	c.822G>A (p.Trp274Stop)	C2	Descrita	Patogénica	SI
GBM	8	c.830C>T (p.Thr277Ile)	C2	Descrita	Patogénica	-
GBM	8	c.830delC (p.Thr277AsnfsX14)	C2	No descrita	Patogénica	Disminuida
GBM	8	c.875_876insA (p.Asn292LysfsX6)	C2	No descrita	Patogénica	NO
GBM	8	c.1003C>T (p.Arg335Stop)	C2	Descrita	Patogénica	SI
GBM	8	c.1003C>T (p.Arg335Stop)	C2	Descrita	Patogénica	SI
GBM	8	c.1010T>C (p.Phe337Ser)	C2	Descrita	Patogénica	Disminuida

H: mutación en homocigosis.

Encontramos 10 mutaciones *missense*, 5 *nonsense*, 4 inserciones/delecciones y una mutación de *splicing*. El 47.6% de las mutaciones se localizaron en el dominio fosfatasa y el 52.4% en el dominio C2 de la proteína. El estudio del gen *PTEN* en las muestras de DNA de sangre periférica de los casos con mutación confirmó el origen somático de todas las mutaciones.

Trece de las mutaciones identificadas se encuentran descritas previamente en la bibliografía como patogénicas (Tabla 43), presentando la proteína una disminución o una pérdida total de la actividad fosfatasa. En este trabajo describimos por primera vez una mutación *nonsense*, c.264T>G (p.Tyr88Stop), y dos inserciones/delecciones con cambio de la fase de lectura, c.830delC (p.Thr277AsnfsX14) y c.875_876insA (p.Asn292LysfsX6), que consideramos patogénicas por generar proteínas truncadas. Encontramos también 4 casos con mutaciones *missense* de significado desconocido: c.59G>C (p.Gly20Ala), c.451G>C (p.Ala151Pro), c.783G>T (p.Gln261His) y c.521A>G (p.Tyr174Cys), en los que realizamos el estudio de conservación evolutiva

de los aminoácidos afectados y el análisis *in silico* para conocer el efecto de las mutaciones (Tabla 44 y Figura 48).

Tabla 44. Comportamiento teórico de las mutaciones *missense* de significado desconocido encontradas en el gen *PTEN*.

Mutación	Polyphen	Score	PMut	Score	SIFT	Score	Panther	Score
c.59G>C (p.Gly20Ala)	Posiblemente patogénica	0.67	Neutral	0.28	Tolerada	0.07	Deletérea	-3.94
c.451G>C (p.Ala151Pro)	Probablemente patogénica	1.00	Patogénica	0.64	No tolerada	0.04	Deletérea	-6.47
c.783G>T (p.Gln261His)	Probablemente patogénica	0.98	Patogénica	0.55	Tolerada	0.11	Neutral	-2.82
c.521A>G (p.Tyr174Cys)	Probablemente patogénica	0.99	Patogénica	0.70	No tolerada	0.00	Deletérea	-8.38

Las mutaciones p.Ala151Pro y p.Tyr174Cys son consideradas patogénicas por los cuatro programas de predicción y se encuentran en regiones altamente conservadas de la proteína. En diferentes bases de datos aparecen descritos otros cambios de aminoácido que afectan a estas dos posiciones y son considerados también patogénicos.

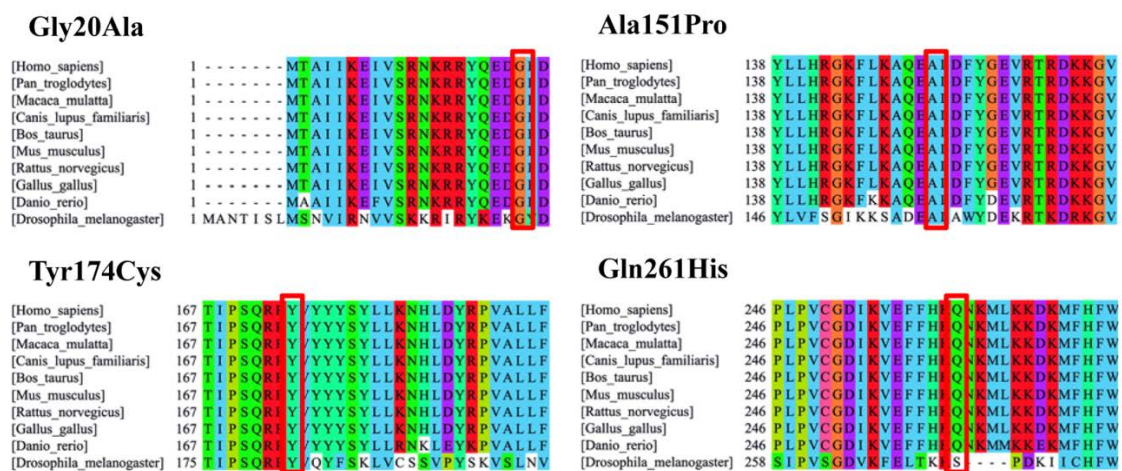


Figura 48. Comparación de la secuencia de la proteína PTEN entre diferentes especies en los casos con mutaciones *missense* no descritas.

Sin embargo, los resultados obtenidos para las otras dos mutaciones, p.Gly20Ala y p.Gln261His, presentan discrepancia. Únicamente dos de los cuatro programas de predicción las consideran patogénicas, a pesar de ser posiciones altamente conservadas. Esto puede deberse a la similitud estructural de los nuevos aminoácidos en la proteína mutada (glicina por alanina y glutamina por histidina). Además, el tumor con la mutación p.Gln261His (exón 7) presentó otras dos mutaciones

en el exón 5 descritas como patogénicas (Tabla 43). Como no disponíamos de RNA de ese paciente para estudiar la pertenencia alélica de cada mutación, subclonamos en el vector pGEMT-Easy la PCR correspondiente al exón 5, observando que las dos mutaciones patogénicas se encontraban en diferentes alelos. Esto nos hace suponer que la mutación de significado desconocido, p.Gln261His, probablemente no sea patogénica al estar en un mismo alelo con otra mutación patogénica.

Hemos encontrado una mutación de *splicing* no descrita previamente, IVS2-1G>A, localizada en un sitio consenso del intrón 2. Amplificamos los exones 1 al 5 del cDNA de *PTEN* mediante RT-PCR para comprobar el efecto de la mutación a nivel de RNA, y obtuvimos dos productos de PCR, uno correspondiente al alelo germinal y otro en el que se producía la pérdida del exón 3 de *PTEN* de 15 aminoácidos (Figura 49A).

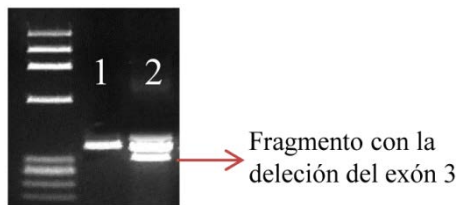


Figura 49A. Análisis de la mutación IVS2-1G>A del gen *PTEN* mediante RT-PCR (muestra 1: control, muestra 2: paciente).

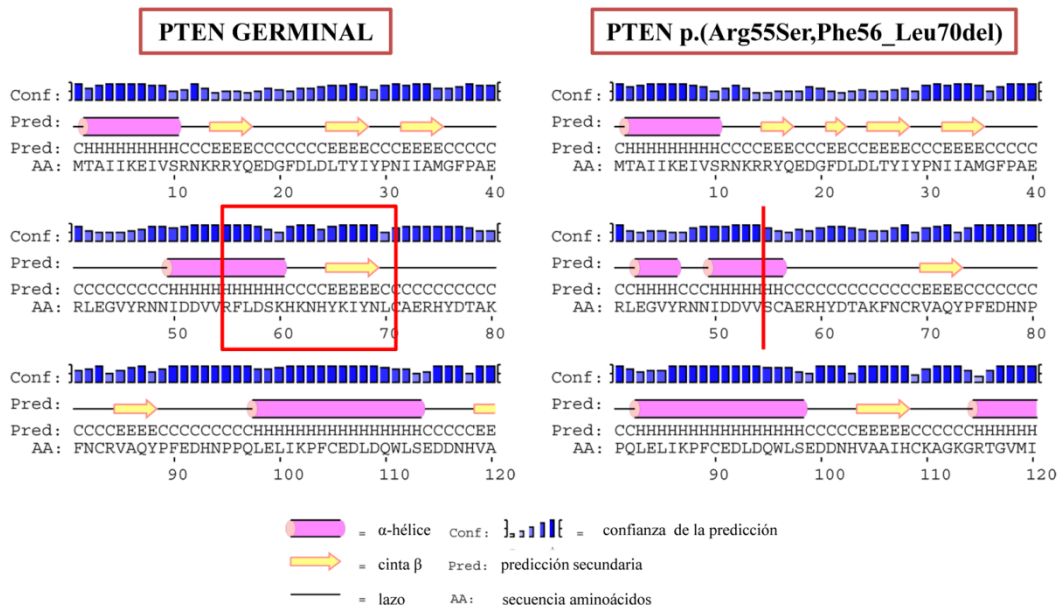


Figura 49B. Estructura secundaria de la proteína PTEN germinal y de la proteína mutada p.(Arg55Ser,Phe56_Leu70del) desde el aminoácido 1 al 120. En rojo se muestran los aminoácidos delecionados.

En el alelo mutado se produce el cambio de arginina por serina en el punto de la pérdida del exón, aunque no se modifica la fase de lectura del resto de la proteína, generando la alteración p.(Arg55Ser,Phe56_Leu70del). Se analizó la mutación resultante mediante el programa de predicción de estructuras secundarias de proteínas PSIREN para determinar los posibles efectos sobre la estructura y el plegamiento de la proteína (Figura 49B). Observamos que la proteína con la mutación p.(Arg55Ser,Phe56_Leu70del) pierde una α -hélice y una cinta- β de una región del dominio fosfatasa que contiene cinco cintas- β empaquetadas con dos α -hélices importantes para su función (221). Además, el estudio de conservación entre especies de la región delecionada mostró una alta conservación de la zona a lo largo de la evolución (Figura 50).

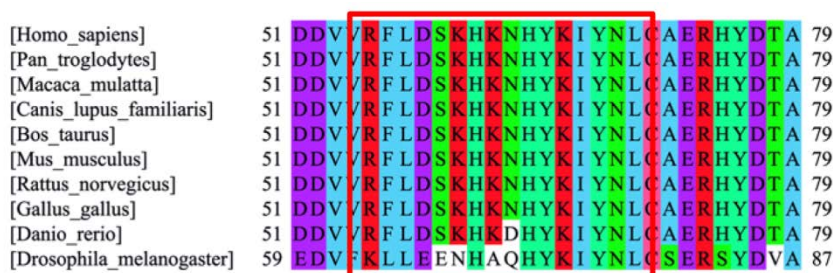


Figura 50. Comparación de la secuencia de la proteína PTEN entre diferentes especies en la zona afectada por la alteración p.(Arg55Ser,Phe56_Leu70del).

Otra mutación que también puede afectar al procesamiento del RNA es el cambio c.493G>A (p.Gly165Arg), localizado en la posición +1 del exón 6. A pesar de que esta mutación está descrita en la literatura, dada la importancia de estas posiciones, decidimos estudiar su efecto a nivel de RNA mediante la amplificación de los exones 5 al 8 del cDNA de *PTEN* mediante RT-PCR (Figura 51). Observamos que se producía la pérdida del exón 6, generando un codón de parada prematuro y la expresión de una proteína truncada.

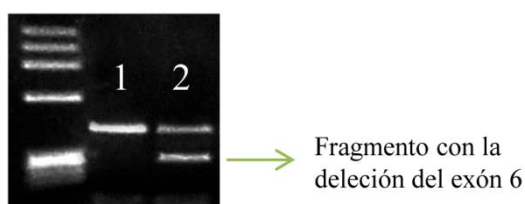


Figura 51. Análisis de la mutación c.493G>A (p.Gly165Arg) del gen *PTEN* mediante RT-PCR (muestra 1: control, muestra 2: paciente).

Además, tres de las mutaciones que encontramos en el gen *PTEN* se hallaban en homocigosis, c.198G>T (p.Lys66Asn), c.388C>T (p.Arg130Stop) y c.521A>G (p.Tyr174Cys). El estudio de la posible pérdida de heterocigidad mediante PCR cuantitativa a tiempo real mostró que en los 3 casos se producía la pérdida del alelo germinal en la muestra tumoral (Figura 52).

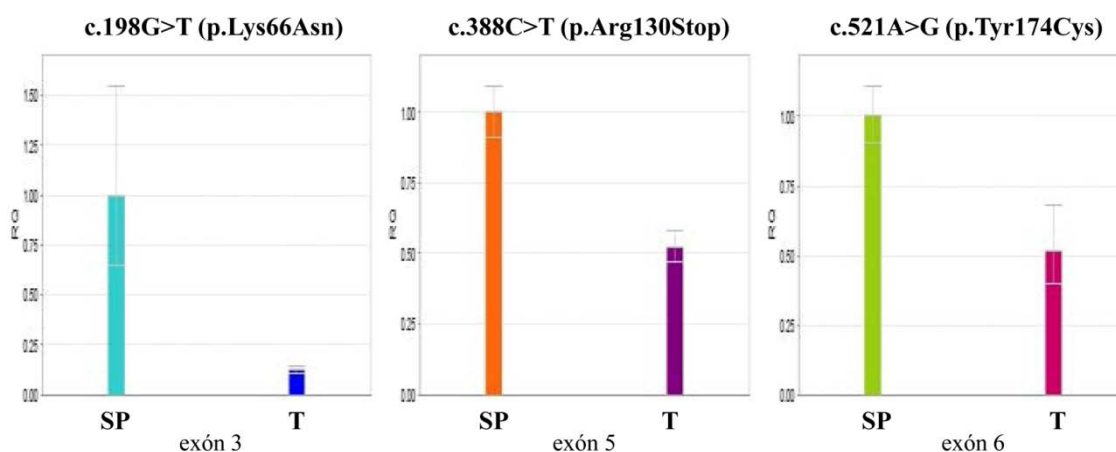


Figura 52. Gráficos del análisis de los casos con mutaciones homocigotas en el gen *PTEN* estudiados por PCR cuantitativa (SP: muestra de DNA de sangre periférica, T: muestra de DNA tumoral).

No encontramos ninguna asociación entre la presencia de mutaciones en el gen *PTEN* y los niveles de expresión de la proteína. Únicamente el 36% de los tumores con mutación presentaron una alteración en la expresión (Tabla 43). No obstante, teniendo en cuenta tanto la presencia de mutaciones en *PTEN* como su delección, observamos que el 90% de los casos con alteraciones en la expresión presentaron mutación y/o delección de *PTEN*, aunque los resultados no llegaron a ser significativos (Tabla 45). Sin embargo, hay un elevado número de casos con mutación y/o delección que mantienen niveles normales de expresión de *PTEN*.

Tabla 45. Relación de las alteraciones en el gen *PTEN* con sus niveles de expresión.

	Expresión de <i>PTEN</i>		P-valor
	Normal	Disminuida/Perdida	
Delección/Mutación <i>PTEN</i>			0.076
Sin alteración	15 (39.5%)	1 (9.1%)	
Delecionado y/o mutado	23 (60.5%)	10 (90.9%)	

Por último, el estudio de las alteraciones en *PTEN* en relación con el pronóstico de los astrocitomas mostró que aquellos pacientes con astrocitomas de alto grado que presentaron mutaciones en el gen *PTEN* tuvieron una mediana de supervivencia menor (13.3 meses vs. 8.3 meses; HR = 2.84 (1.55-5.17); $P < 0.001$) (Figura 53). Además, los tumores con delección del locus de *PTEN* o con disminución de los niveles de expresión de *PTEN* también presentaron un peor pronóstico, aunque los resultados no llegaron a ser significativos.

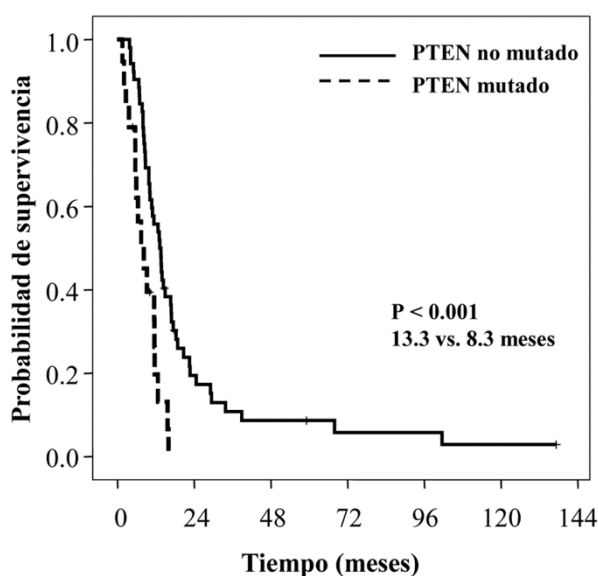


Figura 53. Curvas de supervivencia en función de la presencia de mutaciones en el gen *PTEN* en los pacientes con astrocitomas de alto grado.

1.7. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN BRAF

El oncogén *BRAF* interviene en la cascada de señalización de RAS participando en la regulación del ciclo y la proliferación celular (122). Se encuentra alterado principalmente por mutaciones localizadas en los exones 11 y 15 del dominio quinasa, aunque también se han descrito reordenamientos entre los genes *KIAA1549* y *BRAF* que generan una ganancia de función (31, 124).

- **Análisis de mutaciones en el gen *BRAF***

El análisis de los exones 11 y 15 del gen *BRAF* se llevó a cabo mediante PCR y CSGE-heterodúplex en los astrocitomas de bajo y alto grado. Encontramos únicamente

dos mutaciones patogénicas localizadas en los puntos calientes de la proteína (codones 466 y 600) en un astrocitoma de bajo grado y un astrocitoma anaplásico (Tabla 46).

Tabla 46. Mutaciones encontradas en el gen *BRAF* en astrocitomas de bajo y alto grado.

Caso	Exón	Mutación	Dominio
ABG	15	c.1789T>A (p.Val600Glu)	Quinasa
AA	11	c.1397G>A (p.Gly466Glu)	Quinasa

- **Análisis del reordenamiento KIAA1549: BRAF**

El análisis del reordenamiento entre los genes *KIAA1549* y *BRAF* se estudió mediante RT-PCR con primers que anillan en regiones próximas a los posibles puntos de corte. A pesar de que estos reordenamientos sólo se han descrito en tumores de bajo grado, realizamos el estudio tanto en los astrocitomas de bajo grado como en los de alto grado para confirmar este hecho.

Sólo identificamos un reordenamiento que presentaba los puntos de corte en el exón 15 de *KIAA1549* y en el exón 9 de *BRAF* en un astrocitoma pilocítico (Figura 54).



Figura 54. Análisis del reordenamiento *KIAA1549: BRAF* mediante RT-PCR. Como control se amplificó un fragmento de los exones 6 y 7 del cDNA de *BRAF* que no intervienen en el reordenamiento.

1.8. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN IDH1 E IDH2

La mayor parte de las mutaciones descritas en los genes *IDH1* e *IDH2* se localizan en el exón 4 de ambos genes, en los codones 132 y 172 respectivamente (32). El análisis del exón 4 del gen *IDH1* se llevó a cabo mediante dHPLC y posterior secuenciación para confirmar los resultados, mientras que el estudio del exón 4 de *IDH2* se realizó directamente mediante secuenciación automática.

Hemos encontrado 17 tumores con mutación en el gen *IDH1* y un tumor con mutación en el gen *IDH2*. La frecuencia de mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* fue

significativamente mayor en los astrocitomas de bajo grado (Tabla 47). En el gen *IDH1* todas las mutaciones fueron c.395G>A (p.Arg132His) (94.1%), excepto un astrocitoma de bajo grado que presentó la mutación c.394C>T (p.Arg132Cys) (5.9% de los casos). En cuanto a las mutaciones en el gen *IDH2*, únicamente detectamos un astrocitoma de bajo grado con la mutación c.515G>T (p.Arg172Met).

Tabla 47. Relación de las mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* en función de tipo tumoral.

	Mutación en <i>IDH1/IDH2</i>		
	No mutado	Mutado	P-valor
ABG	8 (34.8%)	15 (65.2%)	<0.001
AA	18 (90.0%)	2 (10.0%)	
GBM	54 (98.2%)	1 (1.8%)	

El análisis de supervivencia reveló que los pacientes con mutaciones en los genes *IDH1/IDH2* tuvieron mejor pronóstico, aunque los resultados únicamente fueron significativos en el grupo de los astrocitomas de alto grado. La mediana de supervivencia en los pacientes con astrocitomas de bajo grado con mutación fue de 122.9 meses frente a los 63.9 meses en los pacientes sin mutación (HR = 2.29 (0.46–11.44); P = 0.296), mientras que en los pacientes con astrocitomas de alto grado la supervivencia mediana fue de 38.9 meses y 11.4 meses respectivamente (HR = 5.36 (1.27 – 22.52); P = 0.011) (Figura 55).

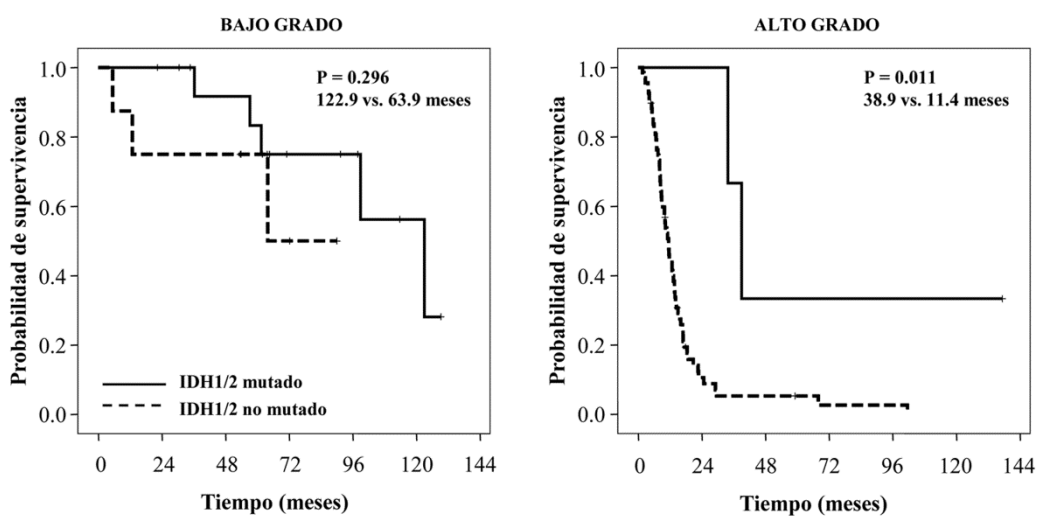


Figura 55. Curvas de supervivencia en función de las mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* en los pacientes con astrocitomas de bajo y alto grado.

1.9. RESUMEN DE LAS PRINCIPALES ALTERACIONES IMPLICADAS EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS

Los astrocitomas son tumores muy heterogéneos tanto morfológica como genéticamente. Presentan múltiples alteraciones en rutas implicadas en proliferación y supervivencia celular, y determinadas alteraciones en unos genes son incompatibles con alteraciones en otros, mientras que ciertos tipos de alteraciones tienden a presentarse simultáneamente en el mismo tumor.

Las principales alteraciones que hemos encontrado relacionadas con la patogénesis de los astrocitomas se resumen en la Tabla 48:

Tabla 48. Resumen de las alteraciones detectadas en las principales rutas implicadas en el desarrollo y la progresión de los astrocitomas.

	Mutación <i>TP53</i>	Amplif. <i>EGFR</i>	Expresión <i>EGFRvIII</i>	Mutación <i>PI3KCA</i>	LOH <i>10q23</i>	Mutación <i>PTEN</i>	Alteración <i>BRAF</i>	Mutación <i>IDH1/IDH2</i>
Astrocitomas Bajo Grado	13 (56.5%)	0 (0.0%)	1 (4.3 %)	-	4 (33.3%)	-	2 (8.7%)	15 (65.2%)
Astrocitomas Alto Grado	17 (22.7%)	26 (35.1%)	23 (33.3%)	5 (6.7%)	49 (75.4%)	19 (25.3%)	1 (1.3%)	3 (4.0%)
Total	30 (30.6%)	26 (35.1%)	24 (26.1%)	5 (6.7%)	53 (68.8%)	19 (25.3%)	3 (3.1%)	18 (18.4%)

Como puede observarse, las mutaciones en los genes *TP53* e *IDH1/IDH2* son mucho más frecuentes en los astrocitomas de bajo grado, mientras que las alteraciones en los genes *EGFR* y *PTEN* predominan en los tumores de alto grado.

El 85.7% de los 105 tumores incluidos en este trabajo mostraron alguna de las alteraciones estudiadas, el 79.2% de los astrocitomas de bajo grado (19 tumores) y el 87.7% de los astrocitomas de alto grado (71 tumores). Además, encontramos un alto número de tumores con más de una alteración, el 54.2% (13 tumores) y el 56.7% (46 tumores) de los astrocitomas de bajo y alto grado respectivamente, presentaron dos o más alteraciones (Tabla 49).

El 43.3% de los tumores con mutación en el gen *TP53* presentaron también mutación en los genes *IDH1* o *IDH2* (13 casos) ($P < 0.001$). El 52.2% de los astrocitomas de bajo grado (12 tumores) portaban mutaciones en ambos genes, mientras que sólo un astrocitoma de alto grado (1.3%) tenía mutaciones en los genes *TP53* e *IDH1* (Tabla 49).

RESVLTADOS

El 71.4% de los astrocitomas estudiados presentaron alguna alteración en los genes *EGFR/PI3KCA/PTEN/BRAF*, el 29.2% de los astrocitomas de bajo grado (7 tumores) y el 84.0% de los astrocitomas de alto grado (68 tumores) ($P < 0.001$). En ambos grupos la alteración más frecuente de esta ruta fue la delección del locus 10q23, seguido después de las alteraciones en *BRAF*, en los tumores de bajo grado, y de las alteraciones en *EGFR*, en los de alto grado (Tabla 49). Observamos que el 26.7% de los astrocitomas de alto grado (20 tumores) presentaban tanto delección del locus de *PTEN* como amplificación del locus de *EGFR*, y el 20.3% (12 tumores) delección y mutación de *PTEN*. Por el contrario, ningún astrocitoma de bajo grado mostró amplificación de *EGFR*.

No encontramos ningún tumor con mutaciones en los genes *PTEN* y *PI3KCA*. Sin embargo, el 8.0% de los astrocitomas de alto grado (6 tumores) presentaron mutaciones tanto en *TP53* como en *PTEN*, y el 2.7% (2 tumores) eran portadores de mutaciones en *TP53* y *PI3KCA*. Además, observamos que el 36.4% de los astrocitomas de bajo grado (4 tumores) y el 13.6% de los de alto grado (8 tumores) presentaron tanto delección del locus de *PTEN* como mutaciones en el gen *TP53*.

Tabla 49. Alteraciones identificadas en **A)** los astrocitomas de bajo grado y **B)** los astrocitomas de alto grado.

A) BAJO GRADO	Mutación TP53	LOH 10q23	Expresión EGFRvIII	Alteración BRAF	Mutación IDH1/IDH2
ABG	Arg342Stop	Delección			
ABG	Arg175His				Arg132His
ABG	Arg175His				Arg132His
ABG	Ile195Phe				Arg132His
ABG	His193Arg	Delección			Arg132His
ABG	Ile195Thr				Arg132His
ABG	Tyr205Cys				Arg132Cys
ABG	Tyr236Cys				Arg132His
ABG	Arg273Cys	Delección			Arg132His
ABG	Arg273Cys	Delección			Arg132His
ABG	Arg273Cys				Arg132His
ABG	Arg273Cys				Arg132His
ABG	Arg273Cys				Arg172Met
ABG	Arg280Gly				Arg132His
ABG			EGFRvIII		
ABG					Arg132His
ABG					Arg132His
ABG					Arg132His
AP				KIAA 15:BRAF 9	
ABG				Val600Glu	

ABG: Astrocitoma de Bajo Grado; AP: Astrocitoma Pilocítico

Por último, realizamos una representación multivariante (biplot logístico) y un análisis de cluster jerárquico en el grupo de pacientes con astrocitomas de alto grado en base a sus alteraciones moleculares (Figura 56). Debido al tamaño de muestra de los pacientes de bajo grado no pudo llevarse a cabo este análisis.

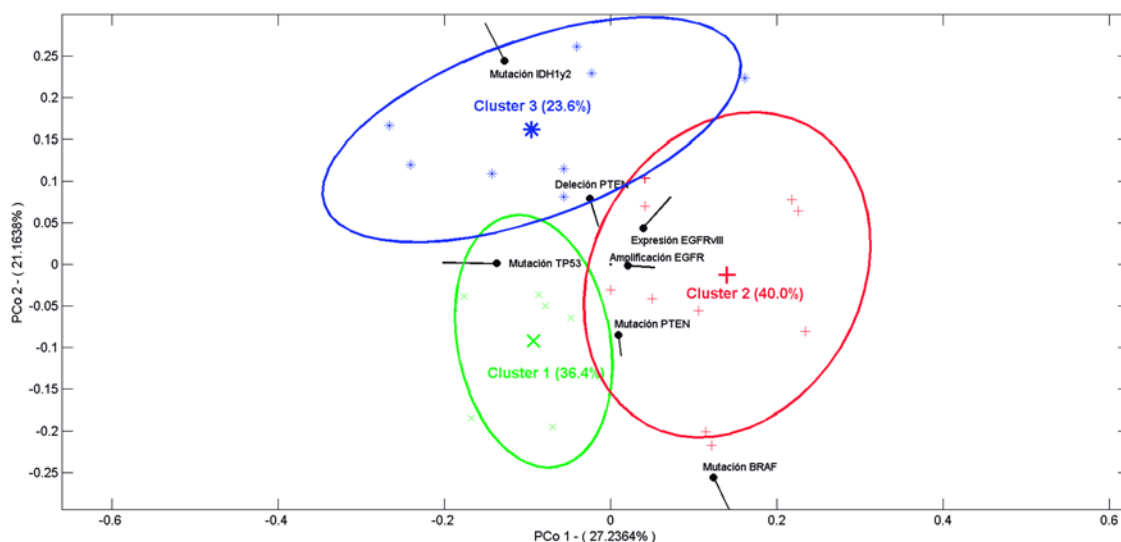


Figura 56. Representación de los tres grupos (*cluster*) obtenidos mediante el análisis de cluster sobre el biplot logístico.

Obtuvimos tres grupos de tumores que presentaban diferentes alteraciones moleculares y, además, la edad de diagnóstico y el pronóstico de los pacientes incluidos en cada grupo también fueron distintos (Tabla 50 y Figura 57).

Tabla 50. Características de los tres grupos establecidos en el análisis multivariante de los astrocitomas de alto grado.

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
Mutación TP53	30.0%	4.5%	38.5%
Amplificación EGFR	0.0%	90.9%	15.4%
Expresión EGFRvIII	10.0%	50.0%	46.2%
Delección PTEN	100%	90.9%	7.7%
Mutación PTEN	40.0%	22.7%	0.0%
Mutación PI3KCA	5.0%	9.1%	7.7%
Mutación IDH1/IDH2	0%	0%	15.4%
Edad, años [IQR]	64 [55.0-67.8]	59.5 [50.0-69.3]	54 [41.0-65.0]

IQR: Rango Intercuartílico

Todos los tumores incluidos en el grupo 1 mostraron delección de *PTEN* y con frecuencia mutaciones en los genes *TP53* y *PTEN*. El grupo 2 estaba formado por tumores que presentaban tanto delección de *PTEN* como amplificación de *EGFR* y, en

muchos casos, también expresión de EGFRvIII y mutaciones en el gen *PTEN*. Sin embargo, los tumores del grupo 3 eran portadores de mutaciones en los genes *TP53* e *IDH1/IDH2* y expresaban EGFRvIII, y no mostraron, en general, ni delección de *PTEN* ni amplificación de *EGFR*. Además, observamos que los pacientes incluidos en el grupo 3 fueron más jóvenes y presentaron mejor pronóstico que los pacientes incluidos en los otros dos grupos (Figura 57).

	Mediana de supervivencia (IC 95%)	HR (IC 95%)	P-valor
Grupo 3	16.7 meses (4.4-28.9)	1.00	
Grupo 2	11.6 meses (8.2-15.0)	2.75 (1.10-6.90)	0.031
Grupo 1	9.2 meses (5.0-13.4)	3.59 (1.46-8.83)	0.005

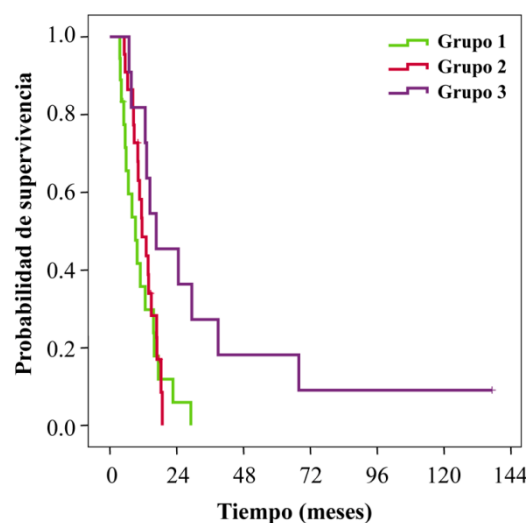


Figura 57. Resultados del análisis de supervivencia y curvas de supervivencia de los pacientes con astrocitomas alto grado en función del grupo al que pertenecen.

2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES REPARADORES DEL DNA EN ASTROCITOMAS

Los cambios polimórficos en un gen pueden afectar a los niveles de transcripción, a la estabilidad y maduración del RNA, o a la función, expresión y plegamiento de la proteína, lo que puede dar lugar a pequeños cambios en su actividad.

Para determinar si variantes polimórficas en genes reparadores del DNA se asocian a cambios en la susceptibilidad al desarrollo de astrocitomas, hemos analizado una población de estudio formada por 36 astrocitomas de bajo grado, 38 astrocitomas anaplásicos y 115 glioblastomas (Tabla 51). Como población control seleccionamos 200 individuos (59.5% hombres y 40.5% mujeres) mayores de 60 años que no tuvieran ningún antecedente personal o familiar de cáncer. El porcentaje de hombres y mujeres fue similar tanto en pacientes como en controles para evitar un sesgo debido al sexo en los resultados.

Tabla 51. Principales características de los pacientes del estudio poblacional, localización del tumor y tratamiento recibido.

	ABG (grado II) n=36	AA (grado III) n=38	GBM (grado IV) n=115
Sexo			
Hombres	21 (58.3%)	23 (60.5%)	68 (59.1%)
Mujeres	15 (41.7%)	15 (39.5%)	47 (40.9%)
Mediana de edad, años [IQR]	34.0 [29.0 - 46.0]	59.0 [45.0 - 68.3]	66.0 [55.8 - 71.0]
Localización del tumor			
• Por hemisferios			
Derecho	11 (30.6%)	18 (47.4%)	62 (53.9%)
Izquierdo	13 (36.1%)	14 (36.8%)	45 (39.1%)
Otra	12 (33.3%)	6 (15.8%)	8 (7.0%)
• Por lóbulos			
Temporal	10 (27.8%)	11 (28.9%)	40 (34.8%)
Frontal	8 (22.2%)	12 (31.6%)	31 (27.0%)
Parietal	5 (13.9%)	3 (7.9%)	21 (18.3%)
Occipital	0 (0.0%)	3 (7.9%)	6 (5.2%)
Otra	13 (36.1%)	9 (23.7%)	17 (14.8%)
Cirugía			
Exéresis total	19 (52.8%)	20 (52.6%)	77 (67.0%)
Exéresis subtotal	17 (47.2%)	18 (47.4%)	38 (33.0%)
Tratamiento post-quirúrgico			
No tratamiento	17 (47.2%)	7 (18.4%)	16 (13.9%)
Radioterapia	11 (30.6%)	13 (34.2%)	57 (49.6%)
Radioterapia + quimioterapia	8 (22.2%)	18 (47.4%)	42 (36.5%)
Mediana de supervivencia, meses [IC 95%]	84.8 [67.1 - 102.5]	13.6 [11.2 - 16.1]	11.4 [9.5 - 13.4]

ABG: Astrocitoma de Bajo Grado; AA: Astrocitoma Anaplásico; GBM: Glioblastoma Multiforme; IQR: Rango Intercuartílico

La edad de los pacientes con astrocitomas de bajo grado fue significativamente inferior a la edad de aparición de los astrocitomas anaplásicos o glioblastomas; sin embargo, todos los tipos tumorales se localizaron preferentemente en los lóbulos temporal y frontal y, en general, en el hemisferio derecho. El tratamiento de primera línea tanto en astrocitomas de bajo como de alto grado fue la extirpación de la masa tumoral mediante cirugía. Además, el 50% de los tumores de bajo grado y más del 80% de los de alto grado recibieron tratamiento posterior de radio y/o quimioterapia.

Hemos estudiado 7 polimorfismos de genes implicados en las cuatro vías principales de reparación de daños en el DNA mediante la técnica de amplificación por PCR con sondas TaqMan (Tabla 52). Se ha analizado la distribución de las frecuencias genotípicas entre los tres grupos de pacientes (astrocitomas de bajo grado, anaplásicos y glioblastomas) y el grupo control; y en aquellos polimorfismos en los que encontramos diferencias estadísticamente significativas, realizamos los modelos logísticos multivariantes correspondientes.

Tabla 52. Relación de los polimorfismos estudiados en genes de reparación el DNA.

MECANISMO DE REPARACIÓN	GEN	POLIMORFISMO
Escisión de nucleótidos (NER)	<i>ERCC1</i>	c.354T>C (p.Asn118Asn) rs11615
	<i>ERCC2</i>	c.2251A>C (p.Lys751Gln) rs13181
	<i>ERCC6</i>	IVS5-8767A>C rs4253079
Escisión de bases (BER)	<i>APEX1</i>	c.444T>G (p.Asp148Glu) rs1130409
	<i>XRCC1</i>	c.1196A>G (p.Gln399Arg) rs25487
Roturas de doble cadena (DSBR)	<i>XRCC3</i>	c.722C>T (p.Thr241Met) rs861539
Emparejamientos erróneos (MMR)	<i>MLH1</i>	c.-93G>A rs1800734

La distribución de los genotipos en cada uno de los polimorfismos analizados en el grupo control cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0.1$).

2.1. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL SISTEMA NER

- **Estudio del polimorfismo c.354T>C (p.Asn118Asn) del gen *ERCC1* (rs11615)**

El análisis de la distribución de los genotipos del polimorfismo c.354T>C (p.Asn118Asn) del gen *ERCC1* no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de astrocitomas de bajo grado, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas, y el grupo control (Tabla 53).

Tabla 53. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.354T>C (p.Asn118Asn) del gen *ERCC1* en los grupos de pacientes y el grupo control.

<i>ERCC1</i> c.354T>C (p.Asn118Asn)				
	TT	TC	CC	P-valor
ABG	15 (41.7%)	15 (41.7%)	6 (16.7%)	0.933
AA	13 (34.2%)	17 (44.7%)	8 (21.1%)	0.660
GBM	41 (35.7%)	62 (53.9%)	12 (10.4%)	0.240
Controles	79 (39.5%)	90 (45.0%)	31 (15.5%)	

- **Estudio del polimorfismo c.2251A>C (p.Lys751Gln) del gen *ERCC2* (rs13181)**

El análisis de la distribución de los genotipos del polimorfismo c.2251A>C (p.Lys751Gln) del gen *ERCC2* mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de astrocitomas anaplásicos y glioblastomas, y el grupo control (Tabla 54). Sin embargo, no encontramos diferencias en la distribución de los genotipos en los astrocitomas de bajo grado.

Tabla 54. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2251A>C (p.Lys751Gln) del gen *ERCC2* en los grupos de pacientes y el grupo control.

<i>ERCC2</i> c.2251A>C (p.Lys751Gln)				
	Lys/Lys	Lys/Gln	Gln/Gln	P-valor
ABG	18 (50.0%)	15 (41.7%)	3 (8.3%)	0.647
AA	13 (34.2%)	23 (60.5%)	2 (5.3%)	0.049
GBM	51 (44.3%)	59 (51.3%)	5 (4.3%)	0.013
Controles	92 (46.0%)	80 (40.0%)	28 (14.0%)	

La frecuencia de homocigotos Gln/Gln fue significativamente menor en el grupo de glioblastomas que en el grupo control (OR = 0.28 (0.11-0.75); P = 0.010) (Tabla 55). Estos resultados indican que el ser portador de dos copias del alelo Gln podría conferir un menor riesgo de desarrollar glioblastomas.

Tabla 55. Análisis del riesgo del polimorfismo c.2251A>C (p.Lys751Gln) del gen *ERCC2* en glioblastomas en función del modelo de herencia.

		<i>ERCC2</i> c.2251A>C (p.Lys751Gln)				
		Controles	GBM	OR	IC 95%	P-valor*
Codominante	Lys/Lys	92 (46.0%)	51 (44.3%)	1.00		
	Lys/Gln	80 (40.0%)	59 (51.3%)	1.33	0.83-2.16	0.239
	Gln/Gln	28 (14.0%)	5 (4.3%)	0.32	0.12-0.87	0.026
Dominante	Lys/Lys	92 (46.0%)	51 (44.3%)	1.00		
	Lys/Gln+Gln/Gln	108 (54.0%)	64 (55.7%)	1.07	0.67-1.70	0.777
Recesivo	Lys/Lys+Lys/Gln	172 (86.0%)	110 (95.7%)	1.00		
	Gln/Gln	28 (14.0%)	5 (4.3%)	0.27	0.10-0.74	0.010

*regresión logística multivariante del genotipo ajustada en función del sexo.

En el grupo de los astrocitomas anaplásicos, la frecuencia de homocigotos Gln/Gln también fue menor que en el grupo control, aunque los resultados de la agrupación de genotipos y el análisis del riesgo no fueron significativos (Tabla 56). Esto podría ser debido al pequeño tamaño de muestra de este subgrupo de pacientes, siendo necesarios más estudios para confirmar el efecto del genotipo Gln/Gln en el riesgo de desarrollar astrocitomas anaplásicos.

Tabla 56. Análisis del riesgo del polimorfismo c.2251A>C (p.Lys751Gln) del gen *ERCC2* en astrocitomas anaplásicos en función del modelo de herencia.

		<i>ERCC2</i> c.2251A>C (p.Lys751Gln)				
		Controles	AA	OR	IC 95%	P-valor*
Codominante	Lys/Lys	92 (46.0%)	13 (34.2%)	1.00		
	Lys/Gln	80 (40.0%)	23 (60.5%)	2.05	0.97-4.31	0.059
	Gln/Gln	28 (14.0%)	2 (5.3%)	0.50	0.10-2.34	0.375
Dominante	Lys/Lys	92 (46.0%)	13 (34.2%)	1.00		
	Lys/Gln+Gln/Gln	108 (54.0%)	25 (65.8%)	1.64	0.79-3.39	0.182
Recesivo	Lys/Lys+Lys/Gln	172 (86.0%)	36 (94.7%)	1.00		
	Gln/Gln	28 (14.0%)	2 (5.3%)	0.34	0.08-1.49	0.152

*regresión logística multivariante del genotipo ajustada en función del sexo.

• **Estudio del polimorfismo IVS5-8767A>C del gen *ERCC6* (rs4253079)**

El estudio del polimorfismo IVS5-8767A>C del gen *ERCC6* mostró una distribución de genotipos similar entre los grupos de pacientes y el grupo control (Tabla 57). En base a lo descrito sobre este polimorfismo en gliomas (222), analizamos también la relación de este polimorfismo con el pronóstico de los astrocitomas, sin encontrar ninguna asociación con la supervivencia de estos pacientes independientemente del grado del tumor.

Tabla 57. Distribución de los genotipos del polimorfismo IVS5-8767A>C del gen *ERCC6* en los grupos de pacientes y el grupo control.

<i>ERCC6</i> IVS5-8767A>C				
	AA	AC	CC	P-valor
ABG	27 (75.0%)	9 (25.0%)	0 (0.0%)	0.249
AA	28 (73.7%)	10 (26.3%)	0 (0.0%)	0.169
GBM	91 (79.1%)	24 (20.9%)	0 (0.0%)	0.205
Controles	169 (84.5%)	29 (14.5%)	2 (1.0%)	

2.2. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL SISTEMA BER

- **Estudio del polimorfismo c.444T>G (p.Asp148Glu) del gen *APEXI* (rs1130409)**

El estudio de la distribución de los genotipos del polimorfismo c.444T>G (p.Asp148Glu) del gen *APEXI* no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de pacientes y el grupo control (Tabla 58).

Tabla 58. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.444T>G (p.Asp148Glu) del gen *APEXI* en los grupos de pacientes y el grupo control.

<i>APEXI</i> c.444T>G (p.Asp148Glu)				
	Asp/Asp	Asp/Glu	Glu/Glu	P-valor
ABG	14 (38.9%)	16 (44.4%)	6 (16.7%)	0.540
AA	8 (21.1%)	16 (42.1%)	14 (36.8%)	0.185
GBM	31 (27.0%)	57 (49.6%)	27 (23.5%)	0.718
Controles	62 (31.0%)	91 (45.5%)	47 (23.5%)	

- **Estudio del polimorfismo c.1196A>G (p.Gln399Arg) del gen *XRCCI* (rs25487)**

El análisis de la distribución de los genotipos del polimorfismo c.1196A>G (p.Gln399Arg) del gen *XRCCI* tampoco mostró diferencias significativas entre los distintos tipos de astrocitomas y el grupo control (Tabla 59).

Tabla 59. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.1196A>G (p.Gln399Arg) del gen *XRCCI* en los grupos de pacientes y el grupo control.

<i>XRCCI</i> c.1196A>G (p.Gln399Arg)				
	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	P-valor
ABG	14 (38.9%)	17 (47.2%)	5 (13.9%)	0.986
AA	16 (42.1%)	18 (47.4%)	4 (10.5%)	0.909
GBM	52 (45.2%)	55 (47.8%)	8 (7.0%)	0.228
Controles	80 (40.0%)	94 (47.0%)	26 (13.0%)	

2.3. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL SISTEMA DSB

- Estudio del polimorfismo c.722C>T (p.Thr241Met) del gen *XRCC3* (rs861539)

El estudio de la distribución de los genotipos del polimorfismo c.722C>T (p.Thr241Met) del gen *XRCC3* no reveló ninguna asociación entre los grupos de astrocitomas de bajo grado, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas, y los controles (Tabla 60).

Tabla 60. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.722C>T (p.Thr241Met) del gen *XRCC3* en los grupos de pacientes y el grupo control.

<i>XRCC3</i> c.722C>T (p.Thr241Met)				
	Thr/Thr	Thr/Met	Met/Met	P-valor
ABG	16 (44.4%)	18 (50.0%)	2 (5.6%)	0.645
AA	13 (34.2%)	20 (52.6%)	5 (13.2%)	0.560
GBM	43 (37.4%)	56 (48.7%)	16 (13.9%)	0.473
Controles	87 (43.5%)	92 (46.0%)	21 (10.5%)	

2.4. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL SISTEMA MMR

- Estudio del polimorfismo c.-93G>A del gen *MLH1* (rs1800734)

El estudio del polimorfismo c.-93G>A de la región promotora del gen *MLH1* no mostró diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos entre los tres grupos de pacientes y el grupo control (Tabla 61).

Tabla 61. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-93G>A del gen *MLH1* en los grupos de pacientes y el grupo control.

<i>MLH1</i> c.-93G>A				
	GG	GA	AA	P-valor
ABG	25 (69.4%)	10 (27.8%)	1 (2.8%)	0.396
AA	25 (65.8%)	12 (31.6%)	1 (2.6%)	0.634
GBM	61 (53.0%)	44 (38.3%)	10 (8.7%)	0.084
Controles	115 (57.5%)	79 (39.5%)	6 (3.0%)	

Sin embargo, la frecuencia de homocigotos AA en el grupo de los pacientes con glioblastoma fue mayor que en el grupo control. Teniendo en cuenta que los valores se encuentran cercanos a la significación (0.084) y que este polimorfismo está relacionado con un mayor riesgo de desarrollar diversos tipos de tumor (177, 223, 224), decidimos

realizar el análisis de agrupación de genotipos y estimar la susceptibilidad a desarrollar glioblastomas en función de este polimorfismo (Tabla 62).

Tabla 62. Análisis del riesgo del polimorfismo c.-93G>A del gen *MLH1* en glioblastomas en función del modelo de herencia.

		<i>MLH1</i> c.-93G>A				
		Controles	GBM	OR	IC 95%	P-valor*
Codominante	GG	115 (57.5%)	61 (53.0%)	1.00		
	GA	79 (39.5%)	44 (38.3%)	1.05	0.65-1.70	0.845
	AA	6 (3.0%)	10 (8.7%)	3.17	1.10-9.17	0.033
Dominante	GG	115 (57.5%)	61 (53.0%)	1.00		
	GA+AA	85 (42.5%)	54 (47.0%)	1.20	0.76-1.90	0.443
Recesivo	GG+GA	194 (97.0%)	105 (91.3%)	1.00		
	AA	6 (3.0%)	10 (8.7%)	3.11	1.10-8.82	0.033

*regresión logística multivariante del genotipo ajustada en función del sexo.

Encontramos una asociación estadísticamente significativa con el genotipo AA, lo que indica que el ser portador de este alelo en homocigosis podría conferir un mayor riesgo de desarrollar glioblastomas (OR = 3.11 (1.10-8.82); P = 0.033).

2.5. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS

Los polimorfismos que se encuentran próximos en el mismo cromosoma pueden estar asociados y encontrarse en desequilibrio de ligamiento. El desequilibrio de ligamiento tiene su origen en el proceso de recombinación meiótica, donde la probabilidad de recombinación entre locus cercanos es muy baja. Normalmente esos locus se heredan en bloque, y el conjunto de polimorfismos que se transmiten juntos a la descendencia se denomina haplotipo.

Realizamos un estudio de haplotipos de los polimorfismos c.354T>C (p.Asn118Asn) del gen *ERCC1* y c.2251A>C (p.Lys751Gln) del gen *ERCC2* involucrados en el sistema de reparación NER. Estos polimorfismos se encuentran localizados próximos en el brazo largo del cromosoma 19, el gen *ERCC1* se localiza en la región 19q13.32 y el gen *ERCC2* en 19q13.3. Aunque el gen *XRCC1* también se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.2), no ha sido incluido en el estudio debido a que participa en la vía de reparación BER y no está en una proximidad cercana con los genes de la ruta NER (225).

El estudio de haplotipos se realizó únicamente en el grupo de los glioblastomas por su mayor tamaño muestral, y mostró que el haplotipo formado por el alelo C (Gln) del gen *ERCC2* y el alelo T del gen *ERCC1* presentaba una menor frecuencia en los pacientes con glioblastoma que en el grupo control (Tabla 63). Los resultados indican que este haplotipo podría conferir un menor riesgo de desarrollar glioblastomas (OR = 0.34 (0.16-0.71); P = 0.0041).

Tabla 63. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos c.354T>C (p.Asn118Asn) del gen *ERCC1* y c.2251A>C (p.Lys751Gln) del gen *ERCC2* en el grupo de glioblastomas.

	Haplotipo		Frecuencia				P-valor
	<i>ERCC2</i>	<i>ERCC1</i>	Total	Controles	GBM	OR (IC 95%)	
1	A	T	0.509	0.481	0.563	1.00	
2	C	C	0.212	0.201	0.237	1.01 (0.66-1.54)	0.97
3	A	C	0.166	0.179	0.137	0.61 (0.36-1.03)	0.067
4	C	T	0.114	0.139	0.063	0.34 (0.16-0.71)	0.0041

3. CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES EN EL SISTEMA DE REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS EN ASTROCITOMAS

El sistema de reparación de emparejamientos erróneos (MMR) es fundamental en el mantenimiento de la integridad y la estabilidad genética. Los defectos en su función están relacionados con el desarrollo de tumores esporádicos así como de tumores asociados al síndrome de Lynch entre los que se encuentran los astrocitomas.

Para la caracterización de alteraciones en el sistema MMR, hemos analizado la expresión de las principales proteínas del sistema, MLH1, MSH2 y MSH6, así como el estado de metilación de sus promotores, en los 105 astrocitomas de bajo y alto grado incluidos en la micromatriz de tejidos. Además, hemos estudiado la inestabilidad de microsátélites y, en aquellos casos con defectos en la expresión de alguna proteína MMR o elevada inestabilidad de microsátélites, hemos realizado el análisis de mutaciones en los genes MMR correspondientes.

- **Análisis de la expresión de las proteínas MMR**

El análisis de la expresión de las proteínas MMR por inmunohistoquímica (Figura 58) mostró una ausencia de expresión de MLH1 en 20 pacientes (19.6%), de MSH2 en 24 pacientes (24.0%) y de MSH6 en 31 pacientes (31.3%).

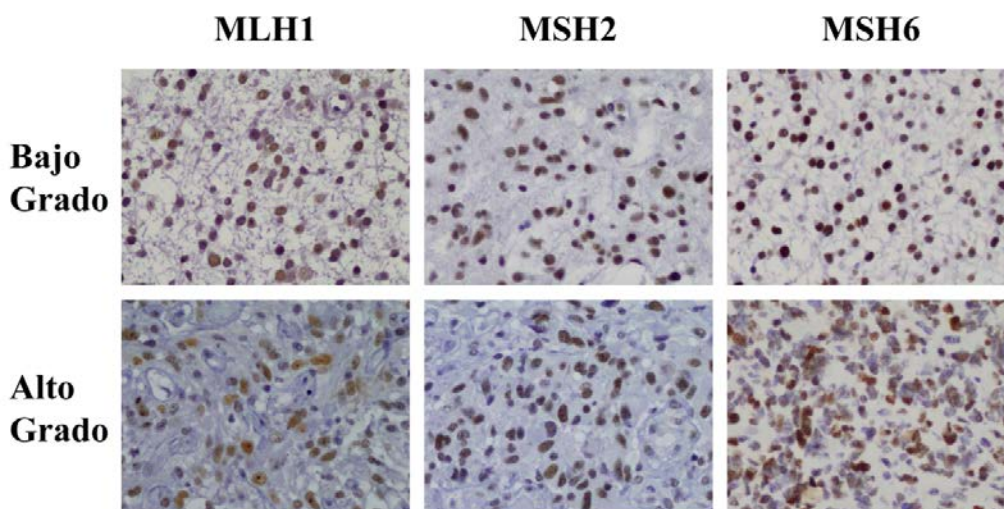


Figura 58. Imágenes representativas de astrocitomas de bajo y alto grado con expresión positiva de MLH1, MSH2 y MSH6.

En 5 tumores detectamos la pérdida simultánea de MSH2 y MSH6, y en 4 tumores encontramos la pérdida conjunta de proteínas que no forman heterodímeros, un caso presentó la pérdida de MLH1 y MSH2, mientras que 3 casos no expresaron MLH1 y MSH6. Además, 9 tumores no expresaban ninguna de las 3 proteínas MMR.

El estudio de la expresión de las proteínas MMR en función del grado de malignidad del tumor reveló que la pérdida de expresión de MSH2 fue significativamente más frecuente en los astrocitomas de bajo grado, mientras que no existían diferencias en los niveles de expresión de MLH1 y MSH6 (Tabla 64).

Tabla 64. Relación de los niveles de expresión de MLH1, MSH2 y MSH6 con el tipo tumoral.

	Astrocitomas de Bajo Grado	Astrocitomas de Alto Grado	P-valor
Expresión de MLH1			0.553
Positiva	19 (86.4%)	63 (78.8%)	
Negativa	3 (13.6%)	17 (21.2%)	
Expresión de MSH2			0.020
Positiva	11 (55.0%)	65 (81.2%)	
Negativa	9 (45.0%)	15 (18.8%)	
Expresión de MSH6			0.643
Positiva	16 (72.7%)	52 (67.5%)	
Negativa	6 (27.3%)	25 (32.5%)	

- **Análisis de la metilación de los promotores MMR**

El análisis del estado de metilación de los promotores de los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* se llevó a cabo mediante MS-MLPA, y mostró que 17 pacientes (16.8%) tenían hipermetilación del promotor del gen *MLH1*, 14 pacientes (14.0%) hipermetilación de *MSH2* y 12 pacientes (11.9%) hipermetilación de *MSH6*, sin diferencias en función del tipo de tumor.

No encontramos ninguna relación entre los niveles de expresión de MSH2 y MSH6, y la metilación de sus promotores. Sin embargo, el estado de metilación de *MLH1* presentó una asociación significativa con la expresión de la proteína MLH1. El 46.7% de los tumores con hipermetilación del promotor mostraron pérdida de expresión de MLH1 (Tabla 65).

Tabla 65. Relación de los niveles de expresión de las proteínas MMR con el estado de metilación de sus promotores.

	Metilación de la región promotora		P-valor
	No hipermetilación	Hipermetilación	
Expresión de MLH1			0.009
Positiva	71 (85.5%)	8 (53.3%)	
Negativa	12 (14.5%)	7 (46.7%)	
Expresión de MSH2			0.476
Positiva	64 (77.1%)	8 (66.7%)	
Negativa	19 (22.9%)	4 (33.3%)	
Expresión de MSH6			1.000
Positiva	58 (68.2%)	7 (70.0%)	
Negativa	27 (31.8%)	3 (30.0%)	

La metilación de *MLH1* se ha determinado mediante el análisis de las sondas de MS-MLPA localizadas en las regiones C y D de la región promotora de *MLH1*, que son las que se encuentran implicadas en la regulación de la expresión génica (213). Las otras sondas se localizan en las regiones A y B. El análisis de la metilación de las regiones A y B, así como el análisis conjunto de la metilación de las cuatro regiones (A-D), no mostró ninguna relación con los niveles de expresión de *MLH1*.

- **Análisis del polimorfismo c.-93G>A de *MLH1* (rs1800734)**

El estudio previo del polimorfismo c.-93G>A de *MLH1* mostró que el genotipo AA se encuentra relacionado con un mayor riesgo de desarrollar glioblastomas. Este polimorfismo se localiza en una región del promotor importante para la actividad transcripcional, por lo que decidimos analizar su relación con los niveles de metilación y expresión de *MLH1*. Observamos que el genotipo AA se encuentra asociado con la hipermetilación del promotor y con la ausencia de expresión de *MLH1* (Tabla 66).

Tabla 66. Relación del polimorfismo c.-93G>A con los niveles de metilación y expresión de *MLH1*.

	Genotipo		P-valor
	GG + GA	AA	
Hipermetilación de <i>MLH1</i>			0.003
No hipermetilado	80 (96.4%)	3 (3.6%)	
Hipermetilado	11 (68.8%)	5 (31.2%)	
Expresión de <i>MLH1</i>			0.049
Positiva	76 (95.0%)	4 (5.0%)	
Negativa	16 (80.0%)	4 (20.0%)	

El análisis conjunto de las tres variables mediante una tabla de contingencia tridimensional para evaluar la existencia de interacciones entre ellas, mostró una relación estadísticamente significativa entre la presencia del genotipo AA, la metilación del promotor y la pérdida de expresión MLH1 (Tabla 67).

Tabla 67. Relación del polimorfismo c.-93G>A con la metilación de la región promotora de *MLH1*, en función de los niveles de expresión de la proteína.

Expresión MLH1	Hipermetilación <i>MLH1</i>	Genotipo		P-valor
		GG + GA	AA	
Positiva	No hipermetilado	68 (97.1%)	2 (2.9%)	0.001
	Hipermetilado	5 (71.4%)	2 (28.6%)	
Negativa	No hipermetilado	11 (91.7%)	1 (8.3%)	
	Hipermetilado	4 (57.1%)	3 (42.9%)	

- **Análisis de la inestabilidad de microsatélites**

El análisis de la inestabilidad de microsatélites (MSI) se llevó a cabo en muestras de DNA de tejido tumoral y de sangre periférica de cada paciente mediante el análisis de 8 marcadores microsatélites: BAT25, BAT26, BAT40, D2S123, D5S346, D17S250, MYCL y PAX6. Los marcadores inestables más frecuentes fueron BAT25 (14.6% de los casos) y BAT40 (13.5% de los casos), mientras que BAT26 fue el marcador que presentó menor inestabilidad (únicamente el 1% de los tumores).

Siguiendo los criterios recomendados para el análisis de MSI (176), 52 tumores (54.2%) fueron clasificados como estables (MSS), 40 tumores (41.7%) presentaron baja inestabilidad (MSI-L) y solamente 4 tumores (4.2%) fueron altamente inestables (MSI-H). Los 4 tumores MSI-H fueron glioblastomas, 3 de los cuales presentaron expresión de las 3 proteínas MMR analizadas, mientras que el otro caso mostró ausencia de expresión de MSH6.

No encontramos ninguna relación entre los niveles de MSI y el grado tumoral, la expresión de las proteínas MMR, la metilación de los promotores MMR o la distribución del polimorfismo c.-93G>A (Tabla 68).

Tabla 68. Relación de los niveles de inestabilidad de microsátélites con el grado tumoral y con las alteraciones estudiadas en el sistema MMR.

	MSS	MSI-L	MSI-H	P-valor
Grado de malignidad				0.236
Astrocitomas de Bajo Grado	15 (68.2%)	7 (31.8%)	0 (0.0%)	
Astrocitomas de Alto Grado	37 (50.0%)	33 (44.6%)	4 (5.4%)	
Expresión de MLH1				0.523
Positiva	41 (80.4%)	29 (76.3%)	4 (100%)	
Negativa	10 (19.6%)	9 (23.7%)	0 (0.0%)	
Hipermetilación de <i>MLH1</i>				0.700
No hipermetilado	42 (82.4%)	35 (87.5%)	3 (75.0%)	
Hipermetilado	9 (17.6%)	5 (12.5%)	1 (25.0%)	
Expresión de MSH2				0.483
Positiva	36 (73.5%)	30 (76.9%)	4 (100%)	
Negativa	13 (26.5%)	9 (23.1%)	0 (0.0%)	
Hipermetilación de <i>MSH2</i>				0.787
No hipermetilado	43 (86.0%)	35 (87.5%)	3 (75.0%)	
Hipermetilado	7 (14.0%)	5 (12.5%)	1 (25.0%)	
Expresión de MSH6				0.272
Positiva	37 (75.5%)	22 (59.5%)	3 (75.0%)	
Negativa	12 (24.5%)	15 (40.5%)	1 (25.0%)	
Hipermetilación de <i>MSH6</i>				0.274
No hipermetilado	47 (92.2%)	33 (82.5%)	4 (100%)	
Hipermetilado	4 (7.8%)	7 (17.5%)	0 (0.0%)	
Polimorfismo c.-93G>A <i>MLH1</i>				0.468
Genotipo GG+GA	48 (92.3%)	37 (92.5%)	3 (75.0%)	
Genotipo AA	4 (7.7%)	3 (7.5%)	1 (25.5%)	

- **Análisis de mutaciones en los genes MMR**

En aquellos tumores que presentaron ausencia de expresión de alguna proteína MMR y/o fueron altamente inestables, realizamos el análisis mutacional de los genes MMR mediante la amplificación por PCR de todos los exones de los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*, y posterior análisis por CSGE-heterodúplex. El estudio de los 44 tumores que cumplieron estas características reveló 8 mutaciones en 6 tumores, 2 astrocitomas de bajo grado y 4 glioblastomas. Además, el análisis de las muestras de DNA de sangre periférica mostró que 5 de los 6 pacientes eran portadores de mutaciones germinales (Tabla 69).

Tabla 69. Mutaciones encontradas en los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* en los tumores con pérdida de expresión de alguna proteína MMR y/o MSI-H.

MSI	Caso	Gen	Edad	Exón	Mutaciones germinales	Mutaciones somáticas	Función	Bibliografía	Expresión MMR	Metilación <i>MLH1</i>
MSS	GBM	<i>MLH1</i>	64	19	c.2146G>A (p.Val716Met)		Desconocida	Descrita	MLH1, MSH2	Hipermetilado
MSS	ABG	<i>MSH2</i>	33	7	c.1159C>G (p.Leu387Val)		Desconocida	No descrita	MSH2	No hipermetilado
MSS	ABG	<i>MSH6</i>	28	10	c.4004A>C (p.Glu1335Ala)		Desconocida	No descrita	MLH1, MSH2, MSH6	No hipermetilado
MSS	GBM	<i>MSH6</i>	59	3'UTR	c.*(24_28)delGTTGA		Desconocida	No descrita	MSH6	No hipermetilado
MSI-L	GBM	<i>MLH1</i>		17		c.1937A>G (p.Tyr646Cys)	Desconocida	Descrita		
	GBM	<i>MSH2</i>		6		c.1064G>A (p.Arg355Lys)	Desconocida	No descrita	MLH1, MSH2, MSH6	Hipermetilado
		<i>MSH2</i>		12		c.1983delA (p.Lys661AsnfsX24)	Patogénica	No descrita		
MSI-H	GBM	<i>MSH2</i>	34	14	c.2239_2240delAT (p.Ile747ArgfsX2)	Pérdida del alelo germinal en tumor	Patogénica	Descrita	MSH6	No hipermetilado

Cuatro tumores sin estabilidad de microsatélites (MSS) fueron portadores de mutaciones germinales de significado desconocido, 3 mutaciones *missense* y una delección. La mutación c.2146G>A (p.Val716Met) en *MLH1* se encontró en un glioblastoma con pérdida de expresión de MLH1 y MSH2 e hipermetilación del promotor de *MLH1*; la mutación c.1159C>G (p.Leu387Val) en *MSH2* en un astrocitoma de bajo grado con ausencia de expresión de MSH2; la mutación c.4004A>C (p.Glu1335Ala) en *MSH6* en un astrocitoma de bajo grado con pérdida de expresión de MLH1, MSH2 y MSH6; y, por último, la delección en el extremo 3' UTR de *MSH6*, c.*(24_28)delGTTGA, fue hallada en un glioblastoma con pérdida de expresión de MSH6 (Tabla 69).

Encontramos un glioblastoma con baja MSI (MSI-L), hipermetilación del promotor de *MLH1* y pérdida de expresión de las proteínas MLH1, MSH2 y MSH6, que presentó tres mutaciones somáticas, una *missense* en *MLH1* de significado desconocido a pesar de estar descrita en la bibliografía, c.1937A>G (p.Tyr646Cys), una delección en *MSH2*, c.1983delA (p.Lys661AsnfsX24), y una *missense* de significado desconocido también en *MSH2*, c.1064G>A (p.Arg355Lys), no descritas previamente (Tabla 69). La mutación c.1983delA (p.Lys661AsnfsX24) en *MSH2* fue considerada patogénica por generar una proteína truncada. No pudimos analizar la pertenencia alélica de las dos mutaciones presentes en el gen *MSH2* ya que se localizan en diferentes exones y no disponíamos de muestra de RNA de ese paciente.

Solamente identificamos un tumor con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) y mutación en alguno de los genes MMR. Un paciente con un glioblastoma diagnosticado a una edad temprana, con historia familiar de cáncer colorrectal y pérdida de expresión de MSH6, mostró una mutación patogénica germinal en *MSH2*, c.2239_2240delAT (p.Ile747ArgfsX2), que genera una proteína truncada. Además, observamos la pérdida del alelo germinal en el tejido tumoral (Figura 59A). La expresión de la proteína MSH2 truncada se mantiene en el tumor, aunque la pérdida de MSH6 puede explicarse debido a que su expresión depende de su interacción con MSH2 y la mutación se localiza en el dominio ATPasa de MSH2 necesario para la formación del complejo MSH2-MSH6 (Figura 59B).

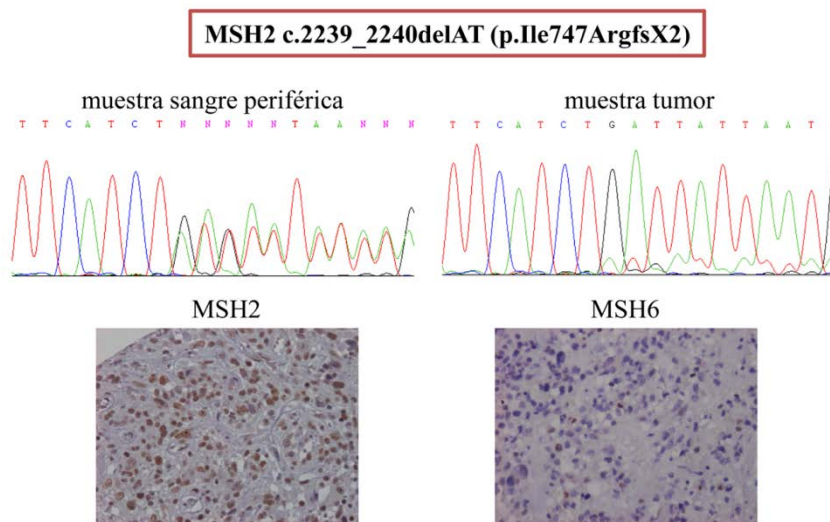


Figura 59. A) Cromatogramas de la mutación c.2239_2240delAT del gen *MSH2* en la muestra de DNA de sangre periférica y de tumor donde se observa la pérdida del alelo germinal. B) Expresión de las proteínas MSH2 y MSH6 en el glioblastoma con la mutación c.2239_2240delAT en el gen *MSH2*.

Las dos únicas mutaciones patogénicas identificadas en los genes MMR en este trabajo han sido, la mutación c.1983delA (p.Lys661AsnfsX24) en *MSH2* en un glioblastoma con MSI-L, y la mutación c.2239_2240delAT (p.Ile747ArgfsX2) en *MSH2* en un glioblastoma con MSI-H, mencionadas anteriormente. La presencia de mutaciones en los genes MMR está relacionada con la inestabilidad de microsatélites, pero también con un aumento de la frecuencia de mutaciones en otros genes. En el glioblastoma con la mutación germinal y MSI-H identificamos además una mutación patogénica en el gen *TP53*, c.586C>T (p.Arg196Stop); mientras que el glioblastoma con MSI-L, además de la mutación patogénica en *MSH2* y dos mutaciones en más en *MLH1* y *MSH2*, era portador de una mutación en el gen *TP53*, c.869G>A (p.Arg290His), y de tres mutaciones en el gen *PTEN*, c.428G>A (p.Gly143Asp), c.491_492insA (p.Lys164LysfsX16) y c.783G>T (p.Gln261His).

Realizamos el estudio de conservación evolutiva de los aminoácidos afectados por las mutaciones *missense* de significado desconocido (Figura 60), así como el estudio predictivo *in silico* de su comportamiento para conocer su efecto (Tabla 70).

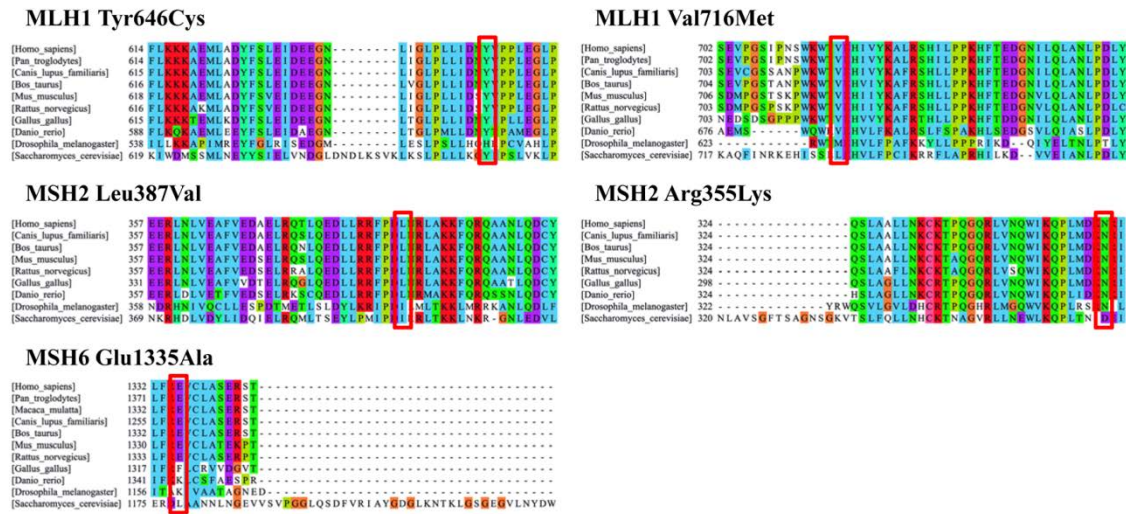


Figura 60. Comparación de la secuencia de MLH1, MSH2 y MSH6 entre diferentes especies en los casos con mutaciones *missense* de significado desconocido.

La mutación c.1937A>G (p.Tyr646Cys) en el gen *MLH1* es considerada patogénica por los 4 programas de predicción y, además, el aminoácido tirosina se encuentra altamente conservado en la evolución. El resto de las mutaciones de significado desconocido analizadas sólo son consideradas como patogénicas por uno o dos programas a pesar de estar localizadas en aminoácidos bastante conservados.

Tabla 70. Comportamiento teórico de las mutaciones *missense* de significado desconocido encontradas en los genes MMR.

Gen	Mutación	Polyphen	Score	PMut	Score	SIFT	Score	Panther	Score
<i>MLH1</i>	c.1937A>G (p.Tyr646Cys)	Probablemente patogénica	1.00	Patogénica	0.76	No tolerada	0.00	Deletérea	-5.71
<i>MLH1</i>	c.2146G>A (p.Val716Met)	Probablemente patogénica	0.97	Neutral	0.44	Tolerada	0.07	Deletérea	-4.35
<i>MSH2</i>	c.1064G>A (p.Arg355Lys)	Benigna	0.002	Neutral	0.10	Tolerada	0.95	Deletérea	-3.60
<i>MSH2</i>	c.1159C>G (p.Leu387Val)	Posiblemente patogénica	0.68	Neutral	0.21	Tolerada	0.14	Deletérea	-4.81
<i>MSH6</i>	c.4004A>C (p.Glu1335Ala)	Benigna	0.01	Neutral	0.25	Tolerada	0.49	Deletérea	-4.27

• **Caracterización de la mutación c.*(24_28)delGTTGA del gen *MSH6***

La mutación c.*(24_28)delGTTGA, localizada en el extremo 3' UTR del gen *MSH6*, se encontró en un glioblastoma que mostró ausencia de expresión de la proteína MSH6 por inmunohistoquímica. Esta región es importante para la estabilidad y la regulación del mRNA de MSH6, por lo que en primer lugar analizamos su expresión

mediante RT-PCR. Detectamos expresión de MSH6 a nivel de RNA que podría deberse a la presencia de la mutación en heterocigosis (Figura 61).

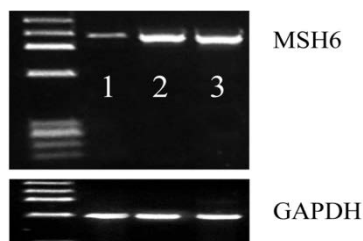


Figura 61. Análisis de la expresión de MSH6 mediante RT-PCR en el tumor con la mutación c.*(24_28)delGTTGA (muestra 1) y en dos controles sanos (muestras 2 y 3).

Con el fin de determinar si la mutación c.*(24_28)delGTTGA daba lugar a diferencias en los niveles de expresión de la proteína, realizamos un ensayo de actividad luciferasa. Los extremos 3' UTR germinal y mutado fueron amplificados a partir del DNA genómico del paciente con la mutación, se separaron los dos alelos mediante la clonación en el vector pGEMT-Easy y, posteriormente, fueron clonados en los sitios de corte XbaI y BamHI del vector pGL3-promoter. El estudio de la actividad luciferasa fue realizado en las líneas celulares COS-1 y T98G, y los resultados no mostraron ninguna diferencia en la actividad luciferasa (RLU) entre los extremos 3' UTR germinal y mutado (Figura 62).

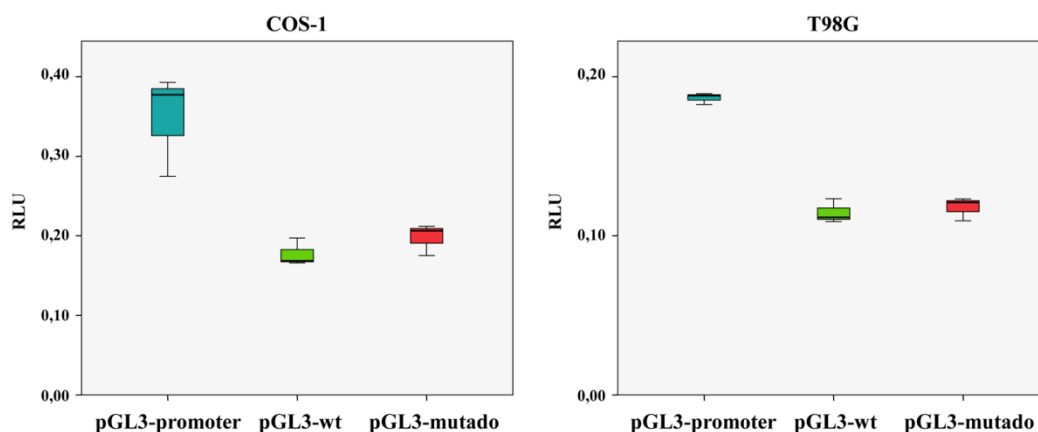


Figura 62. Representación box-plot de los valores normalizados de la actividad luciferasa en las variantes germinal (wt) y mutada del extremo 3' UTR del gen *MSH6*, en las líneas celulares COS-1 y T98G.

Por último, analizamos los microRNAs cuyo anillamiento podría verse afectado por la pérdida de los nucleótidos GTTGA en el extremo 3' UTR. Encontramos dos microRNAs, hsa-miR-505 y hsa-miR-224, que podrían interactuar con esa región

(Figura 63) viéndose afectada la regulación de MSH6, aunque harían falta más estudios para comprobar su unión.

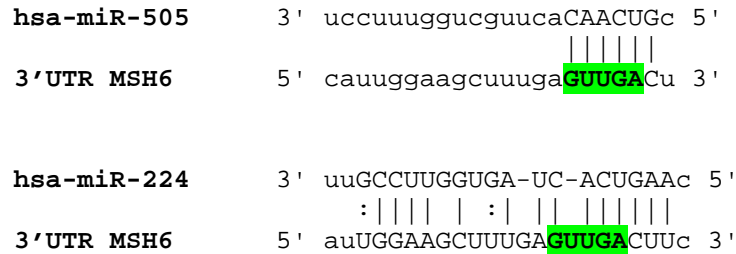


Figura 63. Representación del anillamiento de los microRNAs hsa-miR-505 y hsa-miR-224 con la región 3' UTR del gen *MSH6*. En verde se muestra la posición de la deleción c.*(24_28)delGTTGA.

• **Implicación pronóstica de las alteraciones MMR**

Hemos realizado un análisis de supervivencia para evaluar el efecto de las alteraciones del sistema MMR en el pronóstico de los pacientes con astrocitomas de bajo y alto grado. Nuestros resultados muestran que los pacientes con astrocitomas de alto grado con pérdida de expresión de la proteína MSH6 presentaron una mayor supervivencia (13.8 meses vs. 10.1 meses; HR = 1.78 (1.02-3.11); P = 0.039) (Figura 64). No detectamos asociación de la expresión de MSH6 con el pronóstico de los astrocitomas de bajo grado, probablemente debido al bajo número de pacientes.

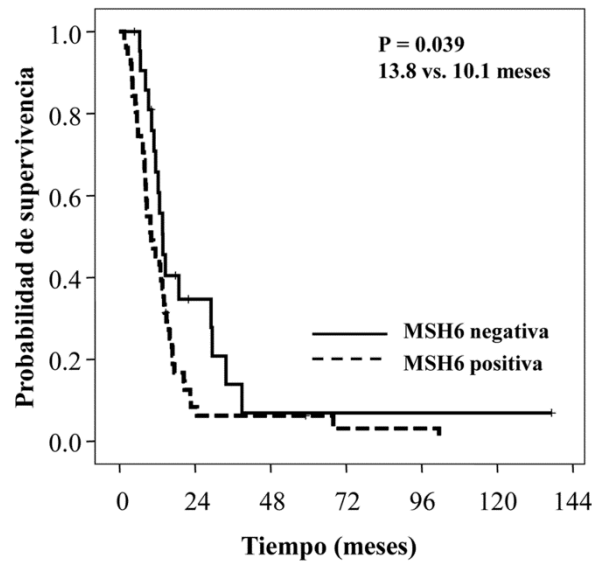


Figura 64. Curvas de supervivencia en función de la expresión de la proteína MSH6 en los pacientes con astrocitomas de alto grado.

4. CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN ASTROCITOMAS

Las alteraciones epigenéticas están implicadas en el desarrollo de múltiples tipos de cáncer, siendo las más importantes la hipermetilación de los promotores génicos y la desacetilación de las histonas.

4.1. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DE MGMT

La enzima MGMT es una proteína que participa en la reparación de daños en el DNA mediante la eliminación de grupos alquilo de la posición O⁶ de la guanina. Su función protege a las células normales de los daños producidos por agentes carcinógenos y confiere a las células tumorales resistencia al tratamiento con agentes quimioterápicos alquilantes, por lo que el silenciamiento del gen *MGMT* por metilación se ha relacionado con el pronóstico de los pacientes (187).

El estudio de la metilación del promotor del gen *MGMT* mediante MS-MLPA mostró que el 50.5% de los tumores presentaban hipermetilación del promotor. No encontramos diferencias en el estado de metilación de *MGMT* entre astrocitomas de bajo y alto grado (Tabla 71).

Tabla 71. Relación del estado de metilación de *MGMT* en función del tipo tumoral.

	Metilación <i>MGMT</i>		P-valor
	No hipermetilado	Hipermetilado	
Astrocitomas de Bajo grado	9 (39.1%)	14 (60.9%)	0.257
Astrocitomas de Alto grado	41 (52.6%)	37 (47.4%)	

Realizamos un análisis de supervivencia en los pacientes con astrocitomas de bajo y de alto grado, independientemente del tratamiento recibido, y no encontramos ninguna diferencia en el pronóstico de los pacientes en función del estado de metilación de *MGMT*. Sin embargo, cuando analizamos el efecto de la metilación de *MGMT* en el pronóstico de los 22 pacientes con astrocitomas de alto grado que recibieron tratamiento con quimioterapia (20 pacientes fueron tratados con temozolamida y 2 pacientes recibieron tratamiento PCV (procarbazona, lomustina y vincristina)), observamos que la mediana de supervivencia fue mayor en los pacientes que

presentaban hipermetilación de *MGMT* (17.4 meses vs. 14.4 meses), aunque las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas ($P = 0.434$) (Figura 65). Debido al bajo número de astrocitomas de bajo grado tratados con quimioterapia no realizamos el estudio en este grupo de pacientes.

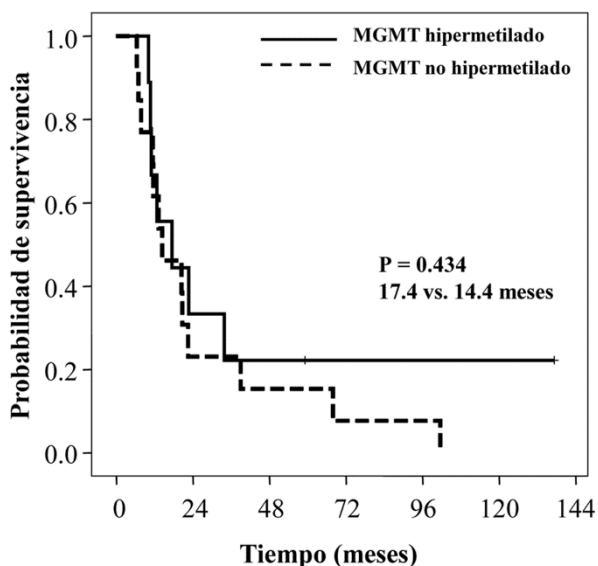


Figura 65. Curvas de supervivencia en función del estado de metilación del promotor del gen *MGMT* en los pacientes con astrocitomas de alto grado tratados con quimioterapia.

4.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE HDACs

Las histona desacetilasas (HDACs) catalizan la eliminación de grupos acetilo de las colas amino terminales de las histonas dando lugar, en general, a una estructura de la cromatina más condensada y transcripcionalmente menos activa. Las alteraciones en los niveles de acetilación de las histonas están implicadas en procesos como la proliferación celular, la angiogénesis o el desarrollo de metástasis (193).

Hemos analizado la expresión de las HDACs de clase I, HDAC1, HDAC2 y HDAC3, por inmunohistoquímica en los astrocitomas de bajo y alto grado incluidos en la micromatriz de tejidos (Figura 66).

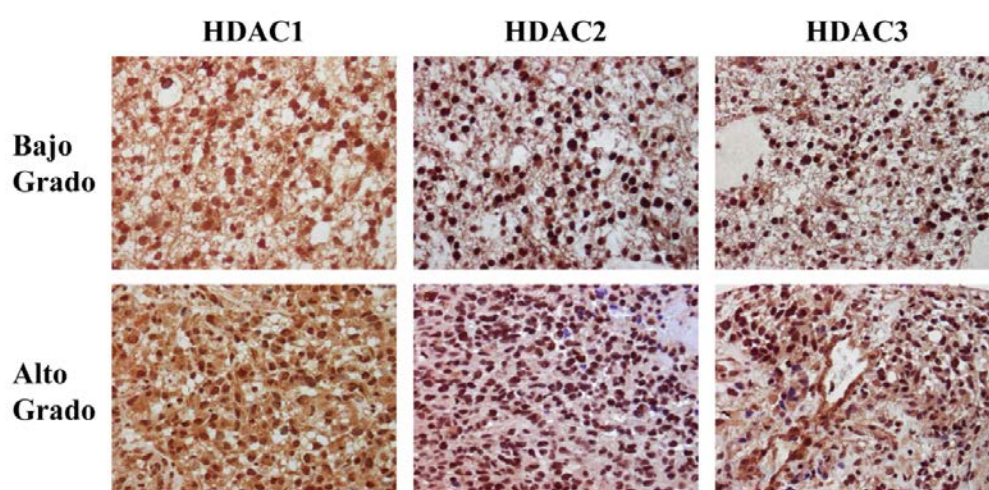


Figura 66. Imágenes representativas de astrocitomas de bajo y alto grado con altos niveles de expresión de histona desacetilasas.

Encontramos altos niveles de expresión (>50% de las células tumorales) de HDAC1 en 58 pacientes (63%), de HDAC2 en 97 pacientes (99%) y de HDAC3 en 62 pacientes (63.3%). La mayor parte de los tumores analizados presentaron altos niveles de expresión de HDAC2 y HDAC3, independientemente del tipo de tumor. Por el contrario, la expresión de HDAC1 se correlacionó con el grado de malignidad, los tumores de alto grado presentaron mayores niveles de expresión de HDAC1 (Tabla 72).

Tabla 72. Relación de los niveles de expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 con el grado de malignidad del tumor.

	Astrocitomas de Bajo grado	Astrocitomas de Alto grado	P-valor
Expresión HDAC1			0.018
Negativa (<50%)	11 (61.1%)	23 (31.1%)	
Positiva (>50%)	7 (38.9%)	51 (68.9%)	
Expresión HDAC2			0.214
Negativa (<50%)	1 (4.8%)	0 (0.0%)	
Positiva (>50%)	20 (95.2%)	77 (100%)	
Expresión HDAC3			0.645
Negativa (<50%)	9 (40.9%)	27 (35.5%)	
Positiva (>50%)	13 (59.1%)	49 (64.5%)	

Además, observamos una correlación entre la expresión de HDAC1, HDAC2 y HDAC3, de manera que el 48.3% de los tumores presentan altos niveles de las tres proteínas (P = 0.005).

Los daños en el SNC provocan la activación de las células gliales denominándose glía reactiva, que tiene el objetivo de mantener la homeostasis tisular (226). En el análisis de la expresión de la proteína HDAC2, hemos detectado la presencia de astrocitos reactivos teñidos por este anticuerpo en 28 tumores (28.6%) (Figura 67).

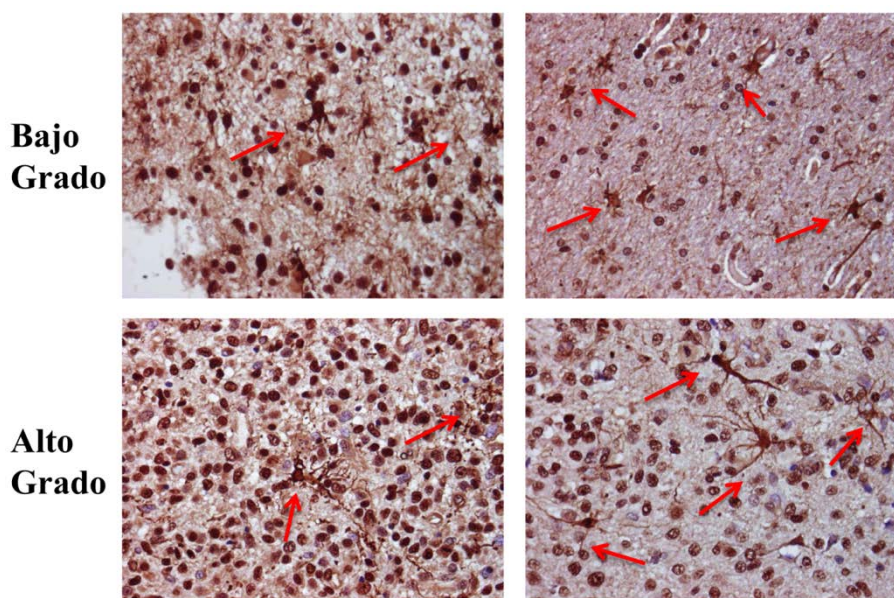


Figura 67. Astrocitomas de bajo grado y alto grado con tinción de glía reactiva.

La expresión de glía reactiva fue significativamente más frecuente en los astrocitomas de bajo grado (Tabla 73).

Tabla 73. Relación de la expresión de la glía reactiva con el tipo tumoral.

	Glía reactiva		P-valor
	NO	SI	
Astrocitomas de Bajo grado	10 (47.6%)	11 (52.4%)	0.006
Astrocitomas de Alto grado	60 (77.9%)	17 (22.1%)	

Por último, la expresión de las HDACs se ha relacionado con el pronóstico de los pacientes en diversos tipos de tumor (227). El análisis en los pacientes con astrocitomas de bajo y alto grado mostró que la expresión de HDAC3 es un factor de buen pronóstico en astrocitomas de alto grado (13.6 meses vs. 12.3 meses; HR = 1.73 (1.02-2.92); P = 0.039) (Figura 68).

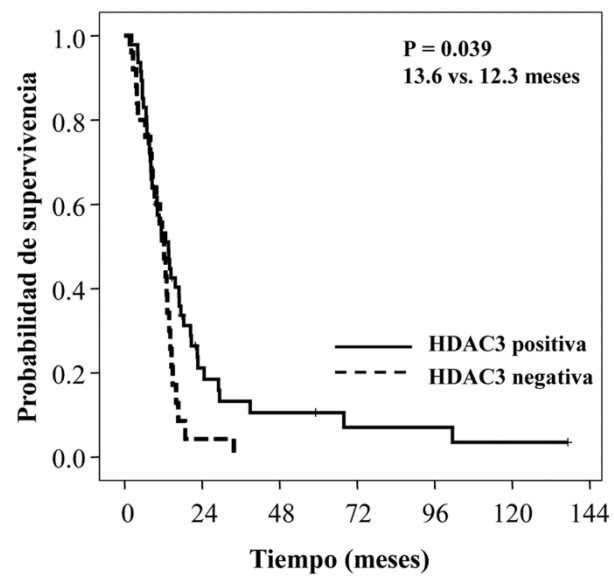


Figura 68. Curva de supervivencia en función de la expresión de HDAC3 en los pacientes con astrocitomas de alto grado.

5. ÍNDICE PRONÓSTICO

El pronóstico de los pacientes con astrocitomas viene determinado principalmente por el grado de malignidad del tumor. La mediana de supervivencia en los pacientes de bajo grado es de unos 5-10 años, mientras que en el caso de los pacientes con tumores de alto grado, la supervivencia mediana es de 12-14 meses, sin muchas diferencias entre los astrocitomas anaplásicos y los glioblastomas.

A lo largo de este trabajo hemos identificado 6 alteraciones moleculares que modifican el pronóstico de los astrocitomas de alto grado de manera univariante. Los resultados en el grupo de los tumores de bajo grado no fueron significativos debido probablemente al tamaño de muestra, por lo que sería necesario realizar estudios en una población mayor para confirmar si estas alteraciones influyen en el tiempo de supervivencia de estos pacientes.

Con las 6 alteraciones moleculares con valor pronóstico: expresión de VRK2, expresión de EGFRvIII, mutaciones en el gen *PTEN*, mutaciones en los genes *IDH1/IDH2*, expresión de MSH6 y expresión de HDAC3, hemos llevado a cabo un análisis de supervivencia multivariante con el fin de determinar aquellos factores que realmente modifican el tiempo de supervivencia de los pacientes con astrocitomas de alto grado (Tabla 74).

Tabla 74. Resultados del análisis de supervivencia univariante y multivariante.

FACTOR	Análisis Univariante		Análisis Multivariante	
	HR (IC 95%)	P-valor	HR (IC 95%)	P-valor
Expresión VRK2	1.86 (1.11-3.10)	0.016	3.01 (1.42-6.38)	0.004
Expresión EGFRvIII	1.96 (1.11-3.47)	0.019	1.03 (0.52-2.02)	0.942
Mutación <i>PTEN</i>	2.84 (1.55-5.17)	<0.001	2.97 (1.43-6.18)	0.004
Mutación <i>IDH1/IDH2</i>	5.36 (1.27-22.52)	0.011	4.56 (0.56-37.27)	0.157
Expresión MSH6	1.78 (1.02-3.11)	0.039	2.37 (1.04-5.39)	0.040
Expresión HDAC3	1.73 (1.02-2.92)	0.039	1.68 (0.87-3.25)	0.124

Únicamente la expresión de VRK2, la presencia de mutaciones en el gen *PTEN* y la expresión de MSH6 modelan la función de riesgos del modelo de Cox. A pesar de que las mutaciones en los genes *IDH1/IDH2* son un factor pronóstico claro en la literatura, la ausencia de significación puede deberse a que son un evento muy poco

frecuente en astrocitomas de alto grado y a que el P-valor del hazard ratio depende del tamaño muestral.

Elaboramos un índice pronóstico con las variables significativas en el que también se incluyó la edad de diagnóstico de los pacientes (categorizada en menores y mayores de 60 años) y el tratamiento recibido (no tratamiento vs. sólo radioterapia vs. radioterapia + quimioterapia), ya que estas dos variables están claramente relacionadas con la supervivencia de los astrocitomas. Este índice nos va a permitir clasificar los pacientes en diferentes grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto).

Tabla 75. Modelo de Cox de las variables seleccionadas para la elaboración del índice pronóstico.

FACTOR	Coefficiente Cox	HR (IC 95%)	P-valor
Expresión de VRK2	1.071	2.92 (1.59-5.36)	0.001
Mutación en PTEN	0.996	2.71 (1.43-5.14)	0.002
Expresión de MSH6	0.980	2.66 (1.37-5.20)	0.004
Edad	0.624	1.87 (1.06-3.29)	0.031
Tratamiento	0.867	2.38 (1.46-3.87)	<0.001

En primer lugar calculamos de nuevo los coeficientes del modelo de Cox de las variables seleccionadas (Tabla 75), y confirmamos que eran estadísticamente significativas independientemente de la edad o del tratamiento recibido. Para la elaboración del índice pronóstico simplificamos los coeficientes de regresión del modelo de Cox siguiendo el procedimiento descrito en Parmar and Machin (215), y obtuvimos así una fórmula del índice pronóstico (IP) sencilla de manejar e interpretar:

$$IP = 21 \times \text{expresión VRK2} + 20 \times \text{mutaciones PTEN} + 20 \times \text{expresión MSH6} + 12 \times \text{edad} + 17 \times \text{tratamiento}$$

Cada paciente tendrá una puntuación en función de sus características para estas 5 variables. Como las categorías de cada una de las variables se encuentran ordenadas de mejor a peor pronóstico (codificadas como 0, 1 y 2), el rango de valores del índice pronóstico se encuentra entre 0 y 107. De esta manera, cuanto peor sea el pronóstico de los pacientes mayor será el valor del índice pronóstico.

Analizando la distribución de los valores del índice pronóstico, con un valor medio de 45.7 y una desviación típica de 21.6, dividimos los pacientes en tres grupos pronóstico (Tabla 76).

Tabla 76. Grupos de riesgo de los pacientes en función del índice pronóstico.

Grupo de riesgo	Valor IP	Pacientes	Mediana supervivencia (IC 95%) (meses)	HR (IC 95%)	P-valor	Tasa de supervivencia		
						1 año	2 años	3 años
Riesgo bajo	0-35	26 (33.8%)	18.8 (11.3-26.3)	1.00		73.1%	32.1%	22.9%
Riesgo medio	36-55	29 (37.7%)	12.7 (9.6-15.8)	2.87 (1.51-5.42)	0.001	51.1%	8.3%	0%
Riesgo alto	56-107	22 (28.6%)	6.9 (4.2-9.5)	7.40 (3.60-15.23)	<0.001	19.5%	0%	0%

Como podemos observar, existe una clara diferencia entre estos tres grupos. La mediana de supervivencia en los pacientes de bajo riesgo es de 18.8 meses, en los de riesgo intermedio es de 12.7 meses, mientras que en los pacientes de peor pronóstico es de 6.9 meses (Figura 69). Según este modelo, aquellos pacientes menores de 60 años que recibieron tratamiento con radio y quimioterapia, con tumores de alto grado con expresión de VRK2, sin mutaciones en *PTEN* y ausencia de expresión de *MSH6*, presentaron mejor pronóstico.

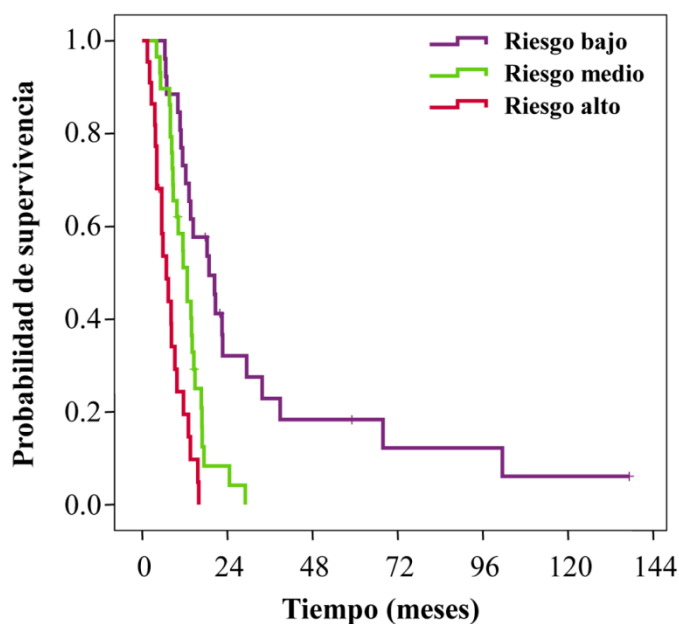


Figura 69. Curvas de supervivencia en función de los grupos de riesgo establecidos de acuerdo con el índice pronóstico en los pacientes con astrocitomas de alto grado.

DISCUSIÓN

Los astrocitomas son los tumores malignos más frecuentes del sistema nervioso central con una tasa de incidencia de 5.27 por cada 100000 habitantes (18). Engloban tumores con distinto grado de malignidad, pero todos ellos presentan una elevada heterogeneidad tanto morfológica como genética que aumenta con el grado de malignidad del tumor (6, 16). Los astrocitomas son tumores altamente infiltrantes, resistentes al tratamiento con radio y/o quimioterapia y, en general, presentan un pronóstico desfavorable con una mediana de supervivencia de 12-15 meses en el caso de los astrocitomas de alto grado (2, 22, 25).

1. ALTERACIONES GENÉTICAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE LOS ASTROCITOMAS

El comportamiento agresivo e infiltrante de los astrocitomas está relacionado directamente con las alteraciones genéticas que presentan. Se desarrollan principalmente como consecuencia de alteraciones en tres tipos de genes: oncogenes, genes supresores de tumores y genes encargados de mantener la estabilidad genética, que afectan a diferentes rutas de señalización que regulan la proliferación celular, la supervivencia, la invasión, la angiogénesis y el metabolismo celular (2, 16, 25, 38).

Las alteraciones genéticas más frecuentes relacionadas con el desarrollo y la progresión de los gliomas comprenden las mutaciones en el gen *TP53*, la amplificación de *EGFR* y la expresión de EGFRvIII, la pérdida del locus de *PTEN* y las mutaciones en el gen *PTEN*, la delección de p16 y p14, la amplificación de *MDM2*, la pérdida conjunta de las regiones cromosómicas de 1p y 19q, y las mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* (18, 19, 32, 35, 96). Es importante señalar que los genes alterados y el orden en el que se alteran normalmente se correlacionan con el tipo histológico y el grado de malignidad del tumor.

1.1. IMPLICACIÓN DE LA RUTA DEL GEN TP53 EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS

El gen supresor tumoral *TP53* es uno de los genes más frecuentemente alterado en cáncer. El 50% de los tumores presentan mutaciones en el gen, mientras que el resto de los casos suelen presentar alteraciones en otros genes de la vía de p53 (49, 50, 65).

Hemos observado altos niveles de expresión de la proteína p53 en aproximadamente el 80% de los astrocitomas analizados, sin encontrar diferencias entre los tumores de bajo y alto grado, aunque la extensión y la intensidad de la tinción fue mayor en los tumores de alto grado, de manera similar a lo publicado previamente por otros autores (228, 229). Clásicamente, la sobreexpresión de p53 se ha considerado un marcador de la presencia de mutaciones en el gen, ya que la mayor parte de las mutaciones que tienen lugar en *TP53* son mutaciones *missense* que alteran la conformación y la función de la proteína y conducen, en general, a la acumulación en el núcleo de altas concentraciones de proteína mutada (52, 229). Sin embargo, no hemos encontrado una relación entre los niveles de expresión de la proteína y la presencia de mutaciones en el gen. Únicamente el 31.6% de los tumores con sobreexpresión de p53 presentaron mutaciones, lo que confirma que la sobreexpresión de la proteína puede tener lugar en ausencia de mutaciones en *TP53*. Diversos estudios han demostrado altos niveles de expresión de p53 germinal tanto en tejidos tumorales como en lesiones no neoplásicas de SNC como gliosis, infarto o enfermedades desmielinizantes (228), y se han descrito grandes discrepancias en la correlación entre los niveles de expresión y la presencia de mutaciones (229, 230). La acumulación de p53 germinal podría suponer un evento fisiológico de respuesta a un daño celular, podría estar relacionado con la senescencia celular, con la presencia de un microambiente inflamatorio, o como consecuencia de alteraciones epigenéticas (228, 230). Además, la proteína MDM2 también puede inducir la acumulación de p53 germinal al unirse a ella e inactivar su función por un mecanismo alternativo que retrasa su degradación (231, 232), y se ha observado que la sobreexpresión de p53 puede deberse a la formación de complejos con oncoproteínas virales que estabilizarían y/o modificarían p53 de manera anómala, aumentando su vida media (45, 233, 234).

Múltiples estudios en diferentes tipos de tumores han asociado tanto la sobreexpresión de p53 como la presencia de mutaciones en el gen *TP53* con una menor supervivencia de los pacientes, aunque en nuestro trabajo no hemos encontrado ninguna relación con el pronóstico de los pacientes con astrocitomas. El valor clínico real de estas alteraciones continúa siendo en la actualidad una de las áreas de estudio de p53 con más controversia. Mientras que las alteraciones en *TP53* están claramente asociadas con un peor pronóstico en los pacientes con cáncer de mama, cabeza y cuello o tumores hematopoyéticos; en otros tumores, como los cerebrales, pulmón o colon, no parecen tener relación con la supervivencia de los pacientes (230, 235-237).

En nuestro estudio, las mutaciones en el gen *TP53* fueron significativamente más frecuentes en los astrocitomas de bajo grado (56.5%) que en los de alto grado (22.7%), lo que se puede relacionar con la implicación de *TP53* en las fases tempranas del desarrollo de estos tumores (19, 238). Además, la distribución de las mutaciones también fue diferente, sugiriendo que la adquisición de mutaciones en *TP53* tiene lugar por distintos mecanismos (19). Mientras que en los astrocitomas de alto grado las mutaciones se encuentran repartidas a lo largo del gen, principalmente en los exones 7 y 8, en los tumores de bajo grado las mutaciones se concentran mayoritariamente en los puntos calientes de la proteína (codones 175, 248, 273 y 282), representado la mutación p.Arg273Cys casi el 40% de las mutaciones de los astrocitomas de bajo grado. Esta mutación se localiza en la superficie de la proteína, en el dominio de unión al DNA, generando la pérdida de interacciones específicas de p53 con el DNA necesarias para su función sin alterar la conformación de la proteína (239). Además, esta mutación está asociada con una mayor agresividad y con la transformación hacia tumores de mayor grado de malignidad (26).

TP53 es un gen supresor tumoral que necesita la inactivación de las dos copias del gen para permitir el desarrollo tumoral según el modelo clásico (240). En este trabajo hemos encontrado seis tumores con mutaciones en homocigosis, dos tumores con mutación en un alelo y pérdida del otro alelo, y un tumor con dos mutaciones distintas que inactivan las dos copias del gen. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la presencia de mutaciones en *TP53* no supone la simple pérdida de la función de la proteína, ya que en algunos casos una mutación *missense* en uno de los alelos es suficiente para inactivar el otro alelo al tener un efecto dominante negativo y/o aportar

a la proteína una ganancia de nuevas funciones que contribuyen al desarrollo tumoral (239, 241). Éste es el caso del 46.7% de las mutaciones identificadas en este trabajo (codones 175, 193, 205, 237, 241, 248, 273 y 282).

El polimorfismo p.Arg72Pro del gen *TP53* se encuentra en la región rica de residuos de prolina, localizada entre el dominio de transactivación y el dominio de unión al DNA, que participa en la inducción de la apoptosis (242). El alelo arginina presenta una mayor capacidad de inducir apoptosis debido, tanto a la activación de la transcripción de genes apoptóticos como PUMA, PERP o AIP1, como a su mayor capacidad de trasladarse a la mitocondria induciendo apoptosis por mecanismos independientes de su actividad transcripcional. Por el contrario, el alelo prolina presenta menor capacidad apoptótica pero induce de manera más eficiente la parada del ciclo celular en la fase G1 en respuesta a daños en el DNA (243-245).

Múltiples estudios han evaluado el riesgo que puede suponer ser portador de este polimorfismo para el desarrollo de astrocitomas, aunque los resultados son contradictorios (246-250). En nuestro trabajo hemos observado que el genotipo Pro/Pro confiere un mayor riesgo de desarrollar astrocitomas de bajo grado, pero no hemos encontrado ninguna asociación con los astrocitomas de mayor grado de malignidad. Recientemente un meta-análisis ha mostrado que el alelo prolina está relacionado con un mayor riesgo de desarrollar gliomas en población europea, lo que se corresponde con la menor eficiencia de este alelo de inducir apoptosis y de proteger a las células del desarrollo tumoral (251).

La proteína p63 pertenece a la familia de factores de transcripción de p53, pero no es un gen supresor tumoral clásico (67). Presenta diversas isoformas con propiedades contrapuestas; mientras que las isoformas largas TAp63 inducen funciones supresoras tumorales como la parada del ciclo celular o la apoptosis, las formas cortas Δ Np63 presentan funciones oncogénicas y se encuentran sobreexpresadas en cáncer (66, 71). La sobreexpresión de p63 está relacionada con mayores niveles de proliferación y tumores más agresivos, lo que se correlaciona en algunos tipos de tumor con un peor pronóstico (67, 72).

En nuestro trabajo hemos evaluado la expresión de p63 con el anticuerpo 4A4, el más ampliamente utilizado a pesar de que reconoce tanto las isoformas ΔN como las TAp63, siendo el primer trabajo que analiza la expresión de p63 en tumores astrocíticos. Nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de p63 están relacionados con el grado de malignidad de los astrocitomas, confirmando que la sobreexpresión de p63 está asociada con una mayor proliferación y agresividad tumoral como se ha descrito en otros tumores (71, 72, 252). Sin embargo, no hemos encontrado ninguna relación entre los niveles de expresión de p63 y el pronóstico de los pacientes, lo que sugiere que p63 podría ser un marcador de proliferación celular pero no de supervivencia en astrocitomas.

No se conocen exactamente las causas que alteran los niveles de p63 en las células tumorales. La expresión de p63 está regulada a nivel transcripcional por múltiples factores de transcripción que se encuentran implicados en el desarrollo tumoral como Notch, NF- κ B o C/EBP, a través de microRNAs, o por las ubiquitina ligasas WWP-1 o MDM2 (72). También se ha visto que p63 se encuentra bajo el control de la vía de PI3K en células epiteliales, y que una mayor activación de la vía de PI3K puede conducir a una sobreexpresión de $\Delta Np63$ (253). En nuestro estudio, el 82.1% de los astrocitomas con sobreexpresión de p63 mostraron alguna alteración en genes de la ruta de EGFR/PI3K/PTEN ($P = 0.001$), que conduce a la activación de la señalización de PI3K y podría ser responsable de la sobreexpresión de p63 en estos tumores.

La familia de las quinasas VRK está implicada en el desarrollo de distintas enfermedades neurológicas, así como en el desarrollo de cáncer (78). VRK1 participa en el control del ciclo y la proliferación celular a través de la regulación de diversos factores de transcripción, en el ensamblaje de la envuelta nuclear y en la condensación de la cromatina (78, 81). Sin embargo, las funciones de VRK2 son menos conocidas, aunque se sabe que interviene en la regulación de rutas mediadas por MAPK quinasas y podría remplazar funcionalmente a VRK1 en algunas situaciones (73, 84).

El análisis de la expresión de VRK1 y VRK2 mostró mayores niveles de ambas proteínas en los astrocitomas de alto grado, consistente con otros trabajos que han

detectado una sobreexpresión de VRK1 y VRK2 a nivel de RNA en glioblastomas (254). No obstante, nuestros resultados del análisis inmunohistoquímico únicamente fueron significativos en el caso de VRK2. Además, la asociación de la expresión de VRK1 con la de p63 tanto en los astrocitomas de alto como de bajo grado y la asociación de la expresión de VRK2 con la de ki-67 en los tumores de alto grado, confirma la relación de las quinasas VRKs con una mayor tasa de proliferación celular, como se ha descrito previamente en tumores de cabeza y cuello y de pulmón (86, 87). En los astrocitomas de bajo grado no hemos podido evaluar la relación entre ki-67 y VRK2 ya que únicamente dos tumores presentaron altos niveles de ki-67.

Por el contrario, no observamos ninguna relación entre la expresión de las VRKs y los niveles de expresión de p53 o la presencia de mutaciones en *TP53*, a pesar de que existe un circuito de autorregulación entre ellos (79, 80, 85). Esto podría ser debido a que, aunque la presencia de mutaciones en *TP53* inactivaría la regulación negativa de las VRKs mediada por p53 germinal aumentando su expresión (87), la sobreexpresión de p53 germinal detectada en los astrocitomas podría favorecer el mantenimiento de los niveles de las VRKs. Estudios previos en tumores de cabeza y cuello tampoco observaron una relación significativa entre la expresión de p53 y la de VRK1 (86).

Nuestro estudio muestra que la expresión de VRK2 en los astrocitomas de alto grado se comporta como un marcador de buen pronóstico que podría relacionarse con el papel de VRK2 en la modulación de señales mitogénicas, de estrés o apoptóticas, que permitirían un crecimiento tumoral más lento. Niveles altos de VRK2 juegan un papel inhibitorio de las señales mitogénicas mediadas por la activación de la vía EGFR/RAS/RAF/MEK, ya que VRK2 retiene en la membrana del retículo endoplasmático la proteína de anclaje KSR1 y disminuye la activación de ERK (84, 255). Por otro lado, niveles elevados de VRK2 inhiben la respuesta celular a estrés inducida por hipoxia y por interleucinas inflamatorias (82, 83), lo que podría contribuir al desarrollo tumoral. Sin embargo, la combinación de todas estas funciones podría inducir un crecimiento más lento y un mejor pronóstico de los pacientes como se ha descrito previamente en cáncer de mama, donde la expresión de VRK2 se encuentra además asociada positivamente con la expresión de los receptores de estrógeno y progesterona e inversamente con la expresión de ERBB2 (84).

1.2. IMPLICACIÓN DE LA RUTA EGFR/PI3K/PTEN/RAS EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS

Una de las aberraciones cromosómicas más frecuentes de los astrocitomas es la amplificación del locus 7p12 donde se localiza *EGFR*, que provoca la activación de las vías de señalización celular PI3K/PTEN/AKT y RAS/RAF/MEK/ERK, implicadas en el control de la proliferación y la migración celular, la evasión de la apoptosis o la angiogénesis (89, 93). En nuestro trabajo, hemos detectado la amplificación de *EGFR* en el 35.1% de los astrocitomas de alto grado, pero no en los astrocitomas de bajo grado, lo que podría explicarse por el comportamiento más agresivo de los tumores portadores de la amplificación del locus de *EGFR* (256).

El gen *EGFR* se encuentra normalmente alterado en cáncer por mutaciones activantes en el dominio tirosina quinasa o por la delección de los exones 2 al 7 del dominio extracelular de *EGFR* dando lugar a la expresión de la proteína EGFRvIII con actividad quinasa constitutiva (93). El análisis del dominio tirosina quinasa no mostró ninguna mutación en nuestra serie, confirmando que las alteraciones en este dominio son muy poco frecuentes en astrocitomas (98, 257, 258). Por el contrario, el 33.3% de los astrocitomas de alto grado y sólo un astrocitoma de bajo grado mostraron expresión de EGFRvIII, lo que refuerza la asociación de EGFRvIII con la mayor proliferación celular e invasividad de los astrocitomas de alto grado (37, 259). Además, el 50.0% de los casos con expresión de EGFRvIII presentaron también la amplificación del locus de *EGFR*, provocando una activación constante y persistente de la ruta de señalización de PI3K (260, 261). Por otro lado, hemos observado que los pacientes que expresaron la variante EGFRvIII presentaron una mayor supervivencia; sin embargo, el valor pronóstico de EGFRvIII en los astrocitomas no está establecido claramente. Mientras que algunos estudios consideran EGFRvIII como un factor de mal pronóstico, otros no encuentran ninguna relación con la supervivencia, y únicamente un estudio ha mostrado una supervivencia mayor en los pacientes con expresión de EGFRvIII (97, 262-265). Además, no se conoce exactamente el mecanismo a través del cual EGFRvIII influiría en la supervivencia de los pacientes. Algunos autores han sugerido que EGFRvIII sería capaz de inducir directamente la activación de la cascada de señalización de PI3K y RAS/ERK estimulando el crecimiento tumoral, mientras que

otros consideran que EGFRvIII puede dimerizar con otros miembros de la familia de receptores tirosina quinasa y producir diferentes respuestas celulares (37, 91, 260).

Durante el estudio de la expresión de EGFRvIII hemos identificado cuatro nuevas variantes con deleciones en los dominios I y II extracelulares (exones 2 al 7) que no modifican la fase de lectura de la proteína y comparten una elevada homología con la variante EGFRvIII, aunque no hemos podido confirmar su estructura completa ni su expresión a nivel de proteína. Además, hemos detectado otra isoforma con estructura similar en dos muestras de tejido de hígado sano, lo que podría sugerir que estas variantes no tuvieran un papel oncogénico, sino que participasen en la proliferación y/o diferenciación normal de los tejidos. Aunque la expresión de EGFRvIII parece ser específica de tejidos tumorales (266), se ha observado su expresión en algunos tipos de tejidos sanos de pulmón, donde EGFRvIII participaría en el desarrollo y mantenimiento normal de estos tejidos (267). Por otro lado, se ha descrito que la activación generada por EGFRvIII en células astrocíticas es diferente a la activación producida en linfocitos ya que, aunque en ambos casos estimula la proliferación celular por la activación de ERK, únicamente produce la activación de AKT en los astrocitos, confiriendo propiedades específicas de tejido (261). Esto sugiere que las isoformas identificadas en este trabajo podrían ejercer distintas funciones dependiendo de su localización tisular, siendo necesarios estudios adicionales para determinar la expresión *in vivo* de las nuevas formas descritas y poder conocer su función tanto en astrocitomas como en tejidos no neoplásicos.

En el análisis de mutaciones en el gen *PI3KCA*, que codifica la subunidad catalítica p110 α de PI3K, hemos encontrado mutaciones en el 6.7% de los astrocitomas de alto grado, lo que concuerda con lo descrito hasta el momento por otros grupos (5-7%) (109, 268, 269), aunque algunos estudios han mostrado un porcentaje mayor de mutaciones en glioblastomas (15-27%) (108, 270), y en otros casos no se detectó ninguna mutación (271). Estas diferencias podrían deberse a los exones de *PI3KCA* analizados en cada estudio ya que, aunque la mayoría (más del 75%) de las mutaciones se localizan en los exones 9 y 20, se han descrito alteraciones en prácticamente todos los exones del gen (102).

Cuatro de las 5 mutaciones identificadas en el gen *PI3KCA* en este trabajo se localizan en los exones 9 y 20, que codifican los dominios helicasa y quinasa respectivamente. Estas cuatro mutaciones se sitúan en los puntos calientes de la proteína, en los codones 545, 546 y 1047, generando a una fuerte actividad quinasa constitutiva que activa la vía de AKT y, con ello, los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular implicados en el desarrollo tumoral (102, 272). También encontramos una mutación en el dominio C2 (exón 7), Pro449Ser, no descrita hasta el momento. Los resultados de los estudios de predicción realizados y la patogenicidad asociada a otros cambios descritos en la posición 449 sugieren que esta mutación podría modificar la función de la proteína. Además, hemos encontrado un polimorfismo de baja frecuencia en la región 3' UTR, c.*29T>C, que podría alterar la regulación de *PI3KCA* mediada por microRNAs, aunque son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

PTEN es un gen supresor tumoral que cataliza la desfosforilación del PIP3 a PIP2, regulando negativamente la actividad de PI3K. La función de *PTEN* se encuentra habitualmente perdida en astrocitomas y conduce a la activación de AKT de manera similar a las mutaciones en *PI3KCA* (35, 100, 116).

En nuestro trabajo, hemos observado que la delección del locus 10q23, donde se localiza *PTEN*, fue significativamente más frecuente en los astrocitomas de alto grado que en los de bajo grado (75.4% vs. 33.3%), lo que confirma que la pérdida de esta región es la alteración genética más frecuente de los astrocitomas de alto grado, estando relacionada con la mayor agresividad de estos tumores (18, 35, 273). Sin embargo, la delección de *PTEN* no se correlacionó con las variaciones en los niveles de expresión de la proteína. Hay que tener en cuenta que, aunque el porcentaje medio de células tumorales con la delección fue del 52.1%, el rango osciló entre el 20% y el 86%; por lo que en muchos casos las diferencias de expresión serían prácticamente indetectables mediante Western blot. A pesar de que algunos tumores presentaron un bajo porcentaje de delección del locus 10q23, se ha descrito que pequeñas variaciones en la dosis génica de *PTEN*, sin necesidad de otro tipo de alteraciones en el mismo locus, son suficientes para favorecer el desarrollo y la progresión tumoral (274).

Aunque la función de PTEN se atribuye principalmente a su actividad fosfatasa, más del 40% de las mutaciones tienen lugar en el dominio carboxilo terminal (116, 275). En nuestra serie, el 25.3% de los astrocitomas de alto grado presentaron mutaciones en el gen *PTEN*, frecuencia similar a lo descrito por otros grupos en gliomas (19, 27, 116), y el 52.4% de las mutaciones se localizaron en el extremo carboxilo de la proteína, indicando que este dominio tiene importantes funciones en la supresión tumoral. Los exones que presentaron mayor número de mutaciones fueron el exón 5 (21.0%), que codifica el dominio catalítico, y el exón 8 (42.1%), que se corresponde con la cola carboxilo terminal de la proteína, importante para las interacciones con los fosfolípidos de membrana y para la estabilidad y localización celular de PTEN (113, 116). Cabe destacar que la mayor parte de las mutaciones *missense* identificadas en este trabajo (60.0%) se localizaron en el dominio fosfatasa, mientras que las mutaciones *nonsense* y las deleciones/inserciones fueron más frecuentes en el dominio C2 (70.0%), lo que indica que el tipo de mutación necesario para adquirir el fenotipo tumoral es distinto en función del dominio del gen (18). Además, no hemos observado ninguna relación entre la presencia de mutaciones en *PTEN* y los niveles de expresión de la proteína, lo que indica que en muchos casos se conserva la expresión de la proteína mutada.

En este trabajo hemos identificado por primera vez tres mutaciones patogénicas en el gen *PTEN*, p.Tyr88Stop, p.Thr277AsnfsX14 y p.Asn292LysfsX6, que generan un codón de parada prematuro y con ello una proteína truncada carente de función. Además, caracterizamos una mutación de *splicing*, IVS2-1G>A, y dos mutaciones *missense*, p.Ala151Pro y p.Tyr174Cys, no descritas previamente que se podrían considerar patogénicas de acuerdo a los resultados de los estudios *in silico* realizados. Sin embargo, hemos hallado otras dos mutaciones *missense*, p.Gly20Ala y p.Gln264His, que probablemente no modifiquen la actividad de la proteína, aunque son necesarios más estudios para confirmarlo.

Al igual que el gen *TP53*, *PTEN* es un gen supresor tumoral que requiere la inactivación de los dos alelos para favorecer el desarrollo tumoral (240). En este sentido, hemos encontrado tres tumores que presentaron pérdida de heterocigosidad y un tumor que mostró dos mutaciones patogénicas distintas que inactivaban las dos copias del gen; pero en la mayor parte de los tumores tanto las mutaciones como las

deleciones del locus 10q23 se han identificado en heterocigosis. Sin embargo, se ha descrito que la pérdida heterocigota de *PTEN* puede tener graves consecuencias biológicas en la iniciación y la progresión tumoral, e incluso se ha visto que sutiles variaciones en la dosis génica de *PTEN* son suficientes para contribuir al desarrollo tumoral (114, 274).

En general, la pérdida de función de *PTEN* está relacionada con un peor pronóstico de los astrocitomas. Tanto la deleción del locus 10q23, como la presencia de mutaciones en el gen *PTEN*, o las variaciones en los niveles de expresión de *PTEN* han sido relacionadas con una menor supervivencia de los pacientes, aunque los resultados en algunos casos no son concluyentes (35, 256, 276, 277). En nuestro trabajo, la presencia de mutaciones en el gen *PTEN* ha mostrado una fuerte asociación con el pronóstico de los pacientes con astrocitomas de alto grado; sin embargo, no hemos observado una relación significativa entre la deleción de *PTEN* o las alteraciones en los niveles de expresión de la proteína con el pronóstico de los pacientes, aunque aquellos pacientes con deleción de *PTEN* y/o disminución de la expresión de *PTEN* presentaron una menor supervivencia.

Por último, dentro de la vía de señalización de EGFR/PI3K/PTEN/RAS, hemos llevado a cabo el análisis de la serina/treonina quinasa BRAF, que actúa como efector de RAS regulando la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (121, 122). El 90% de las mutaciones puntuales descritas en el gen *BRAF* se localizan en el dominio catalítico de la proteína concentradas en los exones 11 y 15 del gen (124). Al analizar estos dos exones sólo hemos encontrado dos mutaciones patogénicas localizadas en los dos puntos calientes de la proteína (codones 466 y 600) en un astrocitoma de bajo grado y en un astrocitoma anaplásico, lo que confirma la baja frecuencia de mutaciones en *BRAF* en astrocitomas adultos (126, 278). Además, únicamente hemos encontrado un reordenamiento entre los genes *KIAA1549* (exón 15) y *BRAF* (exón 9), que genera una proteína activa constitutivamente, en uno de los dos astrocitomas pilocíticos incluidos en este trabajo, confirmando que esta alteración es característica de este tipo de tumores y que se encuentra ausente en astrocitomas de mayor grado de malignidad (grados II a IV) (31). Estos resultados muestran que,

aunque en un pequeño conjunto de pacientes, la desregulación de BRAF, y con ello la activación de la cascada RAS/RAF/MEK/ERK, está involucrada en el desarrollo de los astrocitomas.

1.3. IMPLICACIÓN DE LOS GENES IDH1 E IDH2 EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS

Las enzimas IDH1 e IDH2 catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato a α -cetoglutarato produciendo NADPH y participando en la regulación del metabolismo celular (134). El interés por estas proteínas ha crecido notablemente en los últimos años dada la elevada frecuencia de mutaciones en estos genes en gliomas y su implicación en el pronóstico de los pacientes (27, 32). El análisis del exón 4 de los genes *IDH1* e *IDH2*, que es donde se localizan casi de manera exclusiva las mutaciones descritas (codones 132 y 172 respectivamente), mostró que el 65.2% de los astrocitomas de bajo grado, el 10.0% de los astrocitomas anaplásicos y el 1.8% de los glioblastomas eran portadores de mutaciones, estando significativamente relacionadas con el grado de malignidad del tumor y confirmando que es un evento infrecuente en glioblastomas primarios (32, 138). El 94.4% de las mutaciones se localizaron en el gen *IDH1*, el 94.1% de las cuales fueron del tipo p.Arg132His, mientras que únicamente encontramos un paciente con mutación en *IDH2* (32, 142).

Además, hemos observado que tanto los pacientes con astrocitomas de bajo grado como de alto grado portadores de mutaciones en los genes *IDH1* o *IDH2* presentaron una mayor supervivencia, aunque los resultados no llegaron a ser significativos en el grupo de los pacientes de bajo grado debido probablemente al tamaño muestral. Se han propuesto diferentes teorías de cómo las proteínas IDH mutadas promueven el desarrollo de astrocitomas entre las que se encuentran la disminución de los niveles de NADPH o la producción de 2-hidroxiglutarato; sin embargo, se desconoce de qué manera modifican el pronóstico de los pacientes (136-138, 143).

1.4. PERFILES MOLECULARES DE LOS ASTROCITOMAS

La iniciación y la progresión de los astrocitomas suelen ser consecuencia de la acumulación de diversas alteraciones en genes supresores tumorales y/o oncogenes, existiendo dos rutas clásicas en el desarrollo de estos tumores. Más del 90% de los glioblastomas se originan *de novo*, tras una corta historia clínica sin ninguna evidencia de lesiones precursoras de menor grado; por el contrario, los glioblastomas secundarios se desarrollan lentamente a partir de un astrocitoma de bajo grado que evolucionará a formas más anaplásicas, aunque presentan una baja frecuencia debido en gran parte a la elevada mortalidad de los tumores de menor grado. Estos dos subtipos de astrocitomas constituyen dos entidades distintas que afectan a pacientes de diferente edad, se desarrollan a partir de rutas genéticas distintas, muestran diferentes perfiles de expresión e incluso pueden diferir en su respuesta a los tratamientos con radio y/o quimioterapia (16, 19, 25, 26).

En este trabajo hemos podido comprobar que los astrocitomas de bajo grado se caracterizan principalmente por mutaciones en los genes *TP53* e *IDH1* (69.6% de los casos), observando además que el 52.2% de los tumores portaban mutaciones en ambos genes (19, 238). Se cree que las alteraciones en *TP53* e *IDH1* son eventos tempranos clave en la formación de los astrocitomas de bajo grado, mientras que en los glioblastomas primarios son alteraciones poco frecuentes (29, 32, 279). Por el contrario, el 84.0% de los astrocitomas de alto grado mostraron alguna alteración en la vía de EGFR/PI3K/PTEN. Estas alteraciones están relacionadas con la mayor agresividad y capacidad de invasión de estos tumores, y cooperan en la adquisición de fenotipos más agresivos en la evolución de los astrocitomas de bajo grado a formas más anaplásicas (26, 273, 280). Además, existen alteraciones que tienden a aparecer conjuntamente como la amplificación de *EGFR* y la delección de *PTEN* (26.7%) (281), o la presencia de mutación y delección de *PTEN* (20.3%). Sin embargo, las mutaciones en *TP53* y alteraciones en *EGFR* o *PTEN* son poco frecuentes, y las mutaciones en *PTEN* y *PI3KCA* parecen ser excluyentes (26). Esto refleja que alteraciones en distintos genes pueden tener efectos redundantes y no suelen producirse a la vez en el mismo tumor, mientras que otras generan efectos oncogénicos distintos que confieren ventajas adicionales en el desarrollo tumoral (101).

Cabe destacar que las alteraciones en EGFR/PI3K/PTEN son típicas de los glioblastomas primarios, mientras que los astrocitomas anaplásicos comparten muchas alteraciones con los astrocitomas de bajo grado (*TP53* e *IDH1*), y durante su evolución a formas más malignas van adquiriendo mutaciones en la vía de EGFR/PI3K/PTEN (26, 280). Sin embargo, no hemos encontrado el perfil molecular clásico esperado en los astrocitomas anaplásicos (16, 18). La frecuencia de mutaciones en *TP53* e *IDH1* ha sido significativamente inferior que en los astrocitomas de bajo grado, y la presencia de alteraciones en EGFR/PI3K/PTEN ha sido similar a lo observado en el grupo de los glioblastomas (Tabla 77).

Tabla 77. Resumen de las alteraciones encontradas en función del grado de malignidad del tumor.

	Astrocitomas Bajo grado	Astrocitomas Anaplásicos	Glioblastomas Multiformes
Mutación <i>TP53</i>	56.5%	15.0%	25.5%
Mutación <i>IDH1</i>	65.2%	10.0%	1.8%
Amplificación <i>EGFR</i>	0.0%	42.1%	32.7%
Expresión EGFRvIII	4.3%	25.0%	36.7%
Mutación <i>PI3KCA</i>	-	10.0%	5.5%
Delección <i>PTEN</i>	33.3%	77.8%	74.5%
Mutación <i>PTEN</i>	-	10.0%	30.9%

Esto podría explicarse en algunos casos por la dificultad de establecer un diagnóstico histológico claro basado en las características de las células que forman el tumor, donde la diferencia entre un glioblastoma o un astrocitoma anaplásico se basaría en la presencia o no de angiogénesis y/o necrosis en tumores una alta celularidad y actividad mitótica (6, 97, 256). El parecido perfil molecular también podría deberse a la elevada agresividad de los astrocitomas anaplásicos que, a pesar de tener un origen distinto a los glioblastomas primarios, adquieren rápidamente alteraciones genéticas similares sin presentar sus alteraciones histológicas características (26, 280).

Tampoco observamos una diferencia significativa entre el pronóstico de los pacientes con astrocitomas anaplásicos y glioblastomas (13.0 meses vs. 11.5 meses). En general, la supervivencia de los astrocitomas anaplásicos es muy variable ya que puede oscilar desde varios años (como los astrocitomas de bajo grado) a unos pocos meses (como los glioblastomas) (282). Además, varios estudios han demostrado que los perfiles moleculares y de expresión predicen mejor el comportamiento y el pronóstico

de los astrocitomas anaplásicos y los glioblastomas que los criterios histológicos usados para su clasificación (283, 284).

Por último, con el fin de caracterizar de manera más objetiva las alteraciones genéticas y la evolución clínica de los pacientes con astrocitomas de alto grado, independientemente de su histología, realizamos un análisis multivariante mediante un biplot logístico y un análisis de cluster no supervisado, obteniendo tres grupos con perfiles moleculares diferentes que además mostraron diferencias en la edad de diagnóstico y el pronóstico de los pacientes.

Basándonos en las principales alteraciones que caracterizan cada uno de los grupos identificados, observamos que presentaban grandes semejanzas con los subtipos de tumores propuestos en la nueva clasificación molecular de los astrocitomas de alto grado. Esta clasificación fue establecida inicialmente para los glioblastomas primarios, pero algunos trabajos incluyen también los astrocitomas anaplásicos debido a sus similitudes (43, 285). Así, el grupo 3, caracterizado por la presencia de mutaciones en los genes *TP53* e *IDH1* junto con la expresión de EGFRvIII, se correspondería con el subtipo proneural; el grupo 2, que presenta conjuntamente la amplificación de *EGFR* y la delección de *PTEN* así como mutaciones en *PTEN* y la expresión de EGFRvIII, representaría el grupo clásico o proliferativo; mientras que el tipo mesenquimal estaría relacionado con el grupo 1, que muestra tanto la delección de *PTEN* como mutaciones en los genes *PTEN* y *TP53*. Además, los pacientes del grupo 3 (proneural) presentaron una mediana de edad menor y una supervivencia mediana significativamente mayor que los otros dos grupos, similar a lo descrito en general para estos grupos de tumores (43, 285). El peor pronóstico del subtipo clásico se ha relacionado con la fuerte activación de AKT generada por la presencia conjunta de la delección del locus de *PTEN* y la amplificación de *EGFR* en la mayor parte de los tumores de este grupo, acompañada en muchos casos por la presencia de EGFRvIII y mutaciones en *PTEN* (35, 280, 285).

Nuestros resultados corroboran la existencia de distintos subgrupos moleculares de astrocitomas de alto grado que podrían tener un origen y una diferenciación celular diferentes. Además, esta clasificación permite predecir el pronóstico de los pacientes independientemente del tipo histológico, así como su respuesta al tratamiento ya que,

en general, se ha observado que los tumores clásicos a pesar de presentar peor pronóstico son los que mejor responden al tratamiento con radioterapia y temozolamida, mientras que los pacientes del grupo proneural apenas se benefician del tratamiento a pesar de presentar mejor pronóstico (43).

2. POLIMORFISMOS EN GENES REPARADORES DEL DNA ASOCIADOS CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE ASTROCITOMAS

La etiología de los astrocitomas es, en general, desconocida. El único factor de riesgo medioambiental claramente establecido es la exposición a altas dosis de radiación ionizante (8-10), y también existe una predisposición genética a desarrollar tumores cerebrales en familias con síndromes hereditarios poco frecuentes como el síndrome de Li-Fraumeni, la neurofibromatosis 1 y 2 o el síndrome de Lynch, pero representan menos del 5% de los casos (13-15).

Los daños producidos en el DNA en condiciones normales, tanto por factores endógenos como exógenos, son reparados por los diferentes mecanismos de reparación celular que se encargan del mantenimiento de la integridad genética. Los polimorfismos en genes reparadores del DNA pueden afectar a la función de la proteína modificando su capacidad de reparación, lo que puede conferir un riesgo individual de desarrollar un proceso tumoral (286).

• POLIMORFISMOS DEL SISTEMA DE REPARACIÓN NER

El polimorfismo c.354T>C (p.Asn118Asn) del gen *ERCCI* representa un cambio silencioso en la proteína, pero se cree que puede afectar a la estabilidad del mRNA y modificar sus niveles (287). El estudio de este polimorfismo no mostró ninguna asociación con el riesgo de desarrollar astrocitomas. Estos resultados son similares a lo descrito en el único trabajo que analiza este polimorfismo en gliomas (288). En general, este polimorfismo no está relacionado con el desarrollo de cáncer, aunque parece aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón y tumores

relacionados con la exposición al tabaco y, además, podría influir en la respuesta al tratamiento con platino en estos pacientes (289-292).

El gen *ERCC2* está relacionado con tres tipos de síndromes hereditarios: Xeroderma Pigmentosum, Síndrome de Cockayne y tricotiodistrofia, dependiendo de la localización de las mutaciones y, además, se han descrito múltiples polimorfismos que pueden modificar la eficiencia de reparación de la proteína. El polimorfismo c.2251A>C (p.Lys751Gln) se cree que modifica la actividad de la proteína al producir un cambio conformacional en el extremo carboxilo terminal, en el dominio de interacción con la unidad p44 del complejo TFIIH, importante para la activación de la actividad helicasa (293, 294). A pesar de ser uno de los polimorfismos más estudiados en relación con la reparación de daños en el DNA, no está clara su implicación en el desarrollo de cáncer. Nuestros resultados sugieren que el polimorfismo p.Lys751Gln tendría un efecto protector frente al desarrollo de astrocitomas de alto grado, de manera que el genotipo Gln/Gln conferiría una menor susceptibilidad a desarrollar tanto glioblastomas como astrocitomas anaplásicos. Los resultados en el grupo de los astrocitomas anaplásicos se encuentran al borde de la significación, probablemente debido al bajo tamaño de muestra, por lo que son necesarios más estudios para confirmar su asociación. Sin embargo, en la literatura hay descritas muchas contradicciones en relación con el riesgo de desarrollar gliomas y el polimorfismo p.Lys751Gln. Se ha descrito una ausencia de asociación, un mayor riesgo en relación con el alelo Gln o una menor frecuencia del genotipo Gln/Gln en casos que en controles sugiriendo que este genotipo podría prevenir el desarrollo de gliomas, aunque en ningún caso los resultados fueron concluyentes (225, 295-299).

Los genes *ERCC1* y *ERCC2* se localizan en la misma región cromosómica (19q13.3). Se han descrito diferentes patrones de expresión y alteraciones en el número de copias de esta región tanto en gliomas familiares como esporádicos que sugieren que esta región es importante en la patogénesis de estos tumores (300-303). Además, la pérdida del brazo 19q está relacionada con un mejor pronóstico de los gliomas, principalmente de los oligodendrogliomas (25). En nuestro trabajo, hemos detectado un efecto protector del haplotipo formado por el alelo C (Gln) del polimorfismo c.2251A>C (p.Lys751Gln) del gen *ERCC2* y el alelo T del polimorfismo c.354T>C (p.Asn118Asn) del gen *ERCC1* en glioblastomas, a pesar de que el polimorfismo

c.354T>C de *ERCC1* no presentó ninguna relación de manera individual. Este resultado representa un efecto aditivo de los polimorfismos de dos genes implicados en la ruta de reparación por escisión de nucleótidos, sugiriendo que la región cromosómica 19q es importante en la susceptibilidad de desarrollar glioblastoma (225).

El gen *ERCC6* (CSB) está relacionado con el síndrome de Cockayne, aunque se desconoce su implicación en el desarrollo de cáncer. El único estudio publicado en astrocitomas en relación con el polimorfismo IVS5-8767A>C, localizado en el intrón 5 de *ERCC6*, mostró que el genotipo AC confería un mejor pronóstico en los pacientes con gliomas de grado II y III (222); sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado ninguna relación de este polimorfismo ni con el riesgo de desarrollar astrocitomas ni con la supervivencia de los pacientes. Esto podría deberse, por un lado, al bajo número de pacientes de bajo grado y anaplásicos de nuestra muestra y, por otro lado, debe tenerse en cuenta que nosotros únicamente analizamos astrocitomas mientras que en el estudio de Berntsson et al. (222) analizaron conjuntamente astrocitomas y oligodendrogliomas de grados II y III que poseen distintas características y evolución clínica.

• POLIMORFISMOS DEL SISTEMA DE REPARACIÓN BER

El polimorfismo c.444T>G (p.Asp148Glu) es el más frecuente del gen *APEX1*. Se cree que no modifica la estructura de la proteína, de manera que no afectaría ni a la actividad enzimática ni a la unión con el DNA, aunque el cambio de aminoácido podría interferir en la interacción de APEX1 con otras proteínas del sistema BER reduciendo la capacidad de reparación (304). Nuestros análisis no revelaron ningún tipo de asociación entre esta variante y el desarrollo de astrocitomas, confirmando lo encontrado en otros trabajos (225, 297), aunque un estudio mostró un cierto efecto protector de desarrollar gliomas en personas expuestas a radiación ionizante (296).

El polimorfismo c.1196A>G (p.Gln399Arg) del gen *XRCC1* se localiza en el dominio de unión BRCT I y determina un cambio en la conformación tridimensional de la proteína disminuyendo la capacidad de reparación del DNA (305). Su estudio en nuestra serie no mostró ninguna asociación con el riesgo de desarrollar astrocitomas, aunque el efecto de este polimorfismo parece estar relacionado con la composición

genética de la población. Mientras que el polimorfismo p.Gln399Arg no modifica la susceptibilidad de desarrollar gliomas en población caucásica (225, 247, 297, 306, 307), se ha sugerido que el alelo glutamina podría conferir un mayor riesgo de desarrollar gliomas en población de origen asiático (308, 309).

- **POLIMORFISMOS DEL SISTEMA DE REPARACIÓN DSBR**

El estudio del polimorfismo c.722C>T (p.Thr241Met) del gen *XRCC3* no mostró ninguna asociación con la predisposición a desarrollar astrocitomas. Este polimorfismo se localiza fuera del único dominio identificado en la proteína *XRCC3*, el dominio de unión de ATP, y parece que modifica la capacidad de reparación celular aumentando los daños en el DNA (293, 294). Sin embargo, se han comunicado resultados contradictorios en relación con el riesgo de desarrollar gliomas, ya que se ha descrito tanto una ausencia de asociación (247, 296, 297), como que el alelo metionina confiere un mayor riesgo de desarrollar gliomas (306, 310, 311). Esta misma discrepancia se observa también en tumores de mama, pulmón o melanoma (312-316), poniendo en duda el papel de este polimorfismo en la susceptibilidad de desarrollar cáncer a pesar de presentar una menor eficiencia en la reparación del DNA.

- **POLIMORFISMOS DEL SISTEMA DE REPARACIÓN MMR**

Las alteraciones en el gen *MLH1* están relacionadas tanto con el síndrome de Lynch como con el desarrollo de tumores esporádicos (173, 174) y, además, el polimorfismo c.-93G>A ha sido descrito como una variante de baja penetrancia que modifica el riesgo de desarrollar cáncer. Este polimorfismo se localiza en la región promotora del gen *MLH1* en una región importante para la regulación de la transcripción (317, 318). El análisis del polimorfismo c.-93G>A en astrocitomas sugiere que el genotipo AA confiere un mayor riesgo de desarrollar glioblastomas y, aunque no hay publicaciones previas que analicen este polimorfismo en gliomas, nuestros resultados corroboran la susceptibilidad de desarrollar cáncer de colon, mama o pulmón descrita en diversos estudios (177, 223, 224).

En resumen, nuestros resultados sugieren que las variaciones en los mecanismos de reparación del DNA por escisión de nucleótidos y la reparación de emparejamientos erróneos juegan un papel importante en la susceptibilidad a desarrollar glioblastomas. La ausencia de asociación observada en los astrocitomas de bajo grado y anaplásicos debe analizarse teniendo en cuenta que partimos de un tamaño de muestra limitado, por lo que serían necesarios estudios en series más grandes de pacientes para confirmar el efecto de estos polimorfismos en la susceptibilidad a desarrollar tumores de menor grado de malignidad.

3. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA MMR EN EL DESARROLLO DE LOS ASTROCITOMAS

El sistema de reparación de emparejamientos erróneos (MMR) es fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genética al reparar los errores producidos durante el proceso de replicación del DNA (161-163). La pérdida de función de este sistema acelera la acumulación de mutaciones en genes responsables del control del ciclo celular y la apoptosis, favoreciendo el desarrollo de tumores tanto esporádicos como relacionados con el síndrome de Lynch (173, 174). Sólo un 1-4% de los pacientes con síndrome de Lynch tienen probabilidad de desarrollar tumores cerebrales (171), mientras que la mayor parte de los astrocitomas son de origen esporádico y se desconocen las causas genéticas o medioambientales que los producen.

El 42.7% de los astrocitomas analizados mostraron la pérdida de expresión de alguna de las proteínas MMR (MLH1, MSH2 o MSH6). No encontramos diferencias en los niveles de expresión de las proteínas MLH1 y MSH6 entre los astrocitomas de bajo y alto grado; sin embargo, observamos que la ausencia de expresión de MSH2 fue significativamente más frecuente en los astrocitomas de bajo grado. Varios estudios han relacionado los niveles de expresión de MSH2 con la tasa de proliferación celular, de manera que los tumores de alto grado presentarían altos niveles de expresión de MSH2 (319, 320). Además, observamos que la pérdida de expresión de MSH6 fue más frecuente que la ausencia de expresión de MLH1 y MSH2 independientemente del grado de malignidad del tumor, lo que sugiere que esta proteína pueda tener un papel importante en la patogénesis de los astrocitomas.

La pérdida de expresión proteica puede deberse a la metilación aberrante de los residuos de citosina de las islas CpG localizadas en los promotores de los genes, que conduce al silenciamiento transcripcional (180). En el estudio del estado de metilación de los promotores MMR, hemos encontrado una asociación entre la metilación de la región proximal del promotor de *MLH1* (regiones C y D) y la pérdida de expresión de la proteína MLH1. Esta relación no tiene lugar cuando analizamos la metilación de las regiones A y B, o del promotor completo de *MLH1*, corroborando que la metilación de la región proximal es más importante que las regiones “aguas arriba” en la inhibición de la transcripción de *MLH1* (213, 321). Por el contrario, nuestros resultados sugieren que la expresión de las proteínas MSH2 y MSH6 no se encuentran reguladas por el estado de metilación de sus promotores en astrocitomas. Pocos estudios analizan la metilación de *MSH2* y *MSH6* pero, en general, no se ha observado una metilación aberrante ni tampoco una relación con los niveles de expresión de las proteínas (322-324). Únicamente se ha descrito una asociación entre la hipermetilación de *MSH2* y deficiencias en la expresión de MSH2 en tumores de colon relacionados con el síndrome de Lynch, pero no en tumores esporádicos (325, 326).

En cuanto al polimorfismo c.-93G>A del gen *MLH1*, además de la relación del genotipo AA con un mayor riesgo de desarrollar glioblastomas como se ha descrito anteriormente, hemos encontrado una asociación entre el genotipo AA y la hipermetilación y pérdida de expresión de MLH1 que no se había descrito hasta el momento en astrocitomas. Esta variante ha sido relacionada previamente con la pérdida de función del sistema MMR en tumores de colon y endometrio (177, 178, 327). El polimorfismo c.-93G>A se localiza en la región promotora de *MLH1*, en una región clave necesaria para la máxima actividad transcripcional (317), y se ha sugerido que esta asociación indica una especificidad de secuencia para la metilación del DNA y una regulación de la actividad transcripcional específica de alelo (177, 178).

La inestabilidad de microsatélites (MSI) constituye un indicador de la existencia de fallos en el sistema de reparación MMR y es característica de los tumores con síndrome de Lynch, aunque también se observa con menor frecuencia en tumores esporádicos con deficiencias en el sistema MMR (170, 176). El análisis de la inestabilidad de microsatélites mostró una baja incidencia de MSI-H en nuestra serie (4.2%), similar a la descrita en gliomas por otros grupos (322, 328-330). Todos los

casos con MSI-H fueron glioblastomas, lo que sugiere que niveles elevados de inestabilidad están relacionados con un aumento de la proliferación celular. A pesar de que la MSI es una característica molecular producida principalmente por alteraciones en el sistema MMR, no observamos ninguna relación entre la disminución de la expresión de las proteínas MMR analizadas y la presencia de inestabilidad MSI-H o MSI-L. Las deficiencias en el sistema MMR se encuentran claramente asociadas con el estado de MSI en diversos tipos de tumor como cáncer de colon, ovario o endometrio (169, 173, 331); en cambio, en otras entidades tumorales como el meduloblastoma o el sarcoma de Ewing no se ha observado este tipo de relación (332, 333). Estos datos sugieren que las deficiencias en la expresión de las proteínas MLH1, MSH2 y MSH6 se encuentran relacionadas con los niveles de MSI en función del tipo de tumor (333). Además, observamos que los marcadores que presentaron mayor inestabilidad fueron BAT25 y BAT40 en lugar de BAT26, que es el marcador inestable característico relacionado con cáncer colon y el síndrome de Lynch (334). Esta diferencia podría ser debida al origen esporádico de los astrocitomas y también podría indicar que los mecanismos que promueven MSI en astrocitomas serían diferentes a los implicados en cáncer colon.

En los tumores que presentaron alguna alteración en la expresión de las proteínas MMR y/o MSI-H analizamos la presencia de mutaciones en los genes MMR, observando una baja incidencia de mutaciones en astrocitomas. Únicamente hemos identificado dos mutaciones patogénicas, ambas localizadas en el gen *MSH2*. Una de ellas de origen germinal, c.2239_2240delAT (p.Ile747ArgfsX2), en un glioblastoma con MSI-H en una familia con síndrome de Lynch que mostró también una mutación somática en *TP53*; y la otra, c.1983delA (p.Lys661AsnfsX24), de origen somático, se halló en un glioblastoma esporádico con MSI-L que además presentó múltiples mutaciones en otros genes reparadores y supresores de tumores. A pesar de que este paciente no mostró MSI-H presentaría una elevada inestabilidad genética, indicando de nuevo que los mecanismos de inactivación del sistema MMR son diferentes a los que tienen lugar en los tumores de colon. La ausencia de mutaciones en el resto de los tumores con MSI-H que eran de origen esporádico se corresponde con lo descrito en tumores de colon esporádicos con alta inestabilidad donde las mutaciones en los genes MMR son poco frecuentes (170, 175).

Además, encontramos cinco mutaciones *missense* de significado desconocido, dos en *MLH1*, dos en *MSH2* y una en *MSH6*, y una delección en el extremo 3' UTR de *MSH6*, que podrían estar implicadas en la ausencia de expresión de las proteínas correspondientes. Sin embargo, a pesar de que las mutaciones *missense* están localizadas en posiciones altamente conservadas, únicamente la mutación p.Tyr646Cys en el gen *MLH1* parece ser patogénica según los estudios de predicción *in silico* realizados. En cuanto a la mutación c.*(24_28)delGTTGA en el gen *MSH6*, no observamos ninguna variación en la actividad luciferasa sugiriendo que la pérdida de expresión de *MSH6* en ese tumor no es debida a la alteración presente en el extremo 3' UTR, aunque algunos microRNAs podrían verse afectados por la delección, siendo necesarios más estudios para confirmar el efecto de esta mutación.

Por último, hemos observado que la ausencia de expresión de *MSH6* se encuentra relacionada con una mayor supervivencia de los pacientes con astrocitomas de alto grado. Recientemente se ha demostrado la aparición de mutaciones en el gen *MSH6* en gliomas tratados con temozolamida que se han asociado con la resistencia al tratamiento y la progresión tumoral (335). Por otro lado, también se han descrito mutaciones en *MSH6* tanto en tumores sin tratar como en tumores tratados y diversos análisis sugieren que las deficiencias en el sistema MMR no participan en la resistencia clínica al tratamiento con fármacos alquilantes en gliomas (336). Además, en tumores de colon se ha relacionado la pérdida de expresión de las proteínas MMR (*MLH1* y *MSH2*) con un mejor pronóstico de los pacientes (337, 338). Hay que tener en cuenta que todos los astrocitomas incluidos en este trabajo fueron obtenidos en el momento de la cirugía inicial, antes de ningún tratamiento con radio y/o quimioterapia, por lo que la pérdida de expresión de *MSH6* sería una propiedad intrínseca de un grupo de tumores. Y además, en nuestro estudio evaluamos el valor pronóstico de la pérdida de expresión de *MSH6* en los astrocitomas, y ningún tumor fue portador de mutaciones patogénicas en el gen *MSH6*.

4. IMPLICACIÓN DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS

4.1. VALOR PREDICTIVO DE MGMT EN ASTROCITOMAS

La enzima MGMT se encarga de eliminar directa y específicamente las lesiones mutagénicas del DNA de la posición O⁶ de la guanina mediante la transferencia del grupo alquilo de la guanina a una de las cisteínas de MGMT. La alquilación del DNA en esta posición es un evento temprano en la formación de un tumor, ya que la O⁶-metilguanina tiende a aparearse con timina durante la replicación generando un desapareamiento y una transición GC:AT en esa zona. Además, la mayor parte de las mutaciones provocadas por los fármacos alquilantes son alteraciones de este tipo (187, 339). Así, mientras que MGMT protege a las células del daño producido por agentes carcinógenos, en las células tumorales su acción confiere resistencia al tratamiento con agentes quimioterápicos alquilantes y se asocia con un peor pronóstico de los pacientes (40, 41). Muchos tumores muestran pérdida de expresión de MGMT que puede ser debida a diversos mecanismos, aunque en general es atribuida a la metilación de su promotor (340). El estado de metilación del gen *MGMT* se considera un factor de buen pronóstico en los pacientes con gliomas malignos tratados con agentes alquilantes (40, 41).

El análisis del estado de metilación de *MGMT* en nuestra serie mostró hipermetilación del promotor en el 50.5% de los tumores, sin encontrar diferencias significativas en función del grado de malignidad del tumor. Tampoco encontramos ninguna relación entre el estado de metilación de *MGMT* y la presencia de mutaciones en los genes *TP53* e *IDH1* como algunos autores han descrito, aunque existen contradicciones que pueden deberse a que en muchas ocasiones se analizan conjuntamente tumores de grado II a IV y tumores astrocíticos y oligodendrogliales que presentan perfiles moleculares diferentes (18, 34, 341-344). Sin embargo, el análisis de supervivencia en los pacientes de alto grado que recibieron tratamiento quimioterápico mostró una mayor supervivencia en los pacientes con hipermetilación del promotor de *MGMT*, aunque los resultados no fueron significativos debido probablemente al bajo número de pacientes que recibieron quimioterapia (22 pacientes). Cuando realizamos el análisis con todos los pacientes con astrocitomas de alto grado incluidos en el estudio,

independientemente del tratamiento recibido, no observamos ninguna relación con la supervivencia de los pacientes, lo que muestra que la metilación de *MGMT* es un factor predictivo en lugar de un factor pronóstico (345).

4.2. IMPLICACIÓN DE LAS HDACs EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ASTROCITOMAS

Las histona desacetilasas (HDACs) son enzimas que participan en el control de la expresión génica a través de la desacetilación de las histonas. Esto conduce a un estado de mayor compactación del DNA y, en general, a una represión de la transcripción génica (179, 192). Además, las HDACs presentan otros sustratos diferentes a las histonas regulando por otros mecanismos la homeostasis celular (197). Así, las alteraciones en los niveles de acetilación están implicadas en diversos procesos como la proliferación, la migración, la diferenciación o la invasión celular, la angiogénesis o el desarrollo de metástasis (193, 197).

Se han descrito altos niveles de expresión de las desacetilasas de clase I (HDAC1, HDAC2 y HDAC3) en diversos tipos de cáncer y, en algunos casos, se han relacionado con el pronóstico de los pacientes (227); sin embargo, se conoce poco acerca de la desregulación de las HDACs en gliomas. Se ha observado una disminución de los niveles de mRNAs de las HDACs de clase II y IV en glioblastomas en comparación con astrocitomas de bajo grado y tejido cerebral no neoplásico (346) y, en general, las HDACs de clase I presentan altos niveles de expresión en astrocitomas (346-348).

El análisis mediante inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 mostró altos niveles de expresión de las tres proteínas en un elevado número de tumores tanto de bajo como de alto grado. Además, los niveles de expresión de HDAC1 se correlacionaron positivamente con el grado de malignidad del tumor. Esta correlación podría ser debida a la mayor tasa de proliferación e infiltración de los tumores de alto grado, ya que HDAC1, además de promover la proliferación celular a través del silenciamiento de p21, p53 o TGF- β , favorece la expresión de genes implicados en la invasión celular y la angiogénesis como HIF-1 α o VEGF (193).

En el análisis de la expresión de HDAC2 hemos observado que el anticuerpo también teñía astrocitos pertenecientes a la glía reactiva, aunque para confirmar esta hipótesis sería necesario analizar la expresión de la proteína ácida fibrilar (GFAP), que tiñe de manera específica los astrocitos reactivos. Diversos estudios con inhibidores de HDAC han mostrado que estos fármacos tienen propiedades neuroprotectoras y anti-inflamatorias, aunque su mecanismo de acción no es claro. Se cree que bajos niveles de acetilación de las células astrogiales pueden estar relacionados con la activación glial y con la inflamación como mecanismo de defensa del cerebro ante diferentes lesiones (195, 349). Hemos observado que la detección de glía reactiva que expresa HDAC2 fue más frecuente en los astrocitomas de bajo grado, lo que podría estar relacionado con el mayor nivel de diferenciación de estos tumores y la presencia de más astrocitos fibrilares (350), y sugiere que el componente inflamatorio del tumor podría modificar el fenotipo tumoral, asociándose el aumento de glía reactiva con un menor grado de malignidad. Además, el 99% de los astrocitomas analizados, independientemente del grado del tumor, presentaron altos niveles de expresión de HDAC2, lo que sugiere que esta proteína juega un papel importante tanto en la activación de los astrocitos reactivos y el componente inflamatorio que infiltra los astrocitomas como en la patogénesis de los astrocitomas de bajo y alto grado.

En general, la expresión de las HDACs de clase I en cáncer se encuentra relacionada con un peor pronóstico de los pacientes (227). Sin embargo, en nuestro trabajo hemos observado que la expresión de HDAC3 está asociada con una mayor supervivencia de los astrocitomas de alto grado. Aunque las HDACs se expresan de manera ubicua en casi todos los tejidos, presentan diferentes perfiles de expresión y funciones específicas dependiendo del tejido y del tipo de tumor (227, 351), lo que podría influir de diferente manera en el pronóstico de los pacientes. La expresión de HDAC3 se ha relacionado con un mayor grado de malignidad de los gliomas, pero ningún estudio ha mostrado hasta el momento una relación clara con el pronóstico de estos pacientes (347, 348).

5. FACTORES PRONÓSTICO DE LOS ASTROCITOMAS

Los astrocitomas, en general, presentan un pronóstico desfavorable. El grado de malignidad del tumor es considerado el principal factor que determina la supervivencia de los pacientes. Mientras que la supervivencia de los pacientes con astrocitomas de bajo grado (grado II) es del 65% a los 5 años, para los anaplásicos (grado III) la mediana de supervivencia es unos dos años y para los glioblastomas (grado IV) de un año o inferior (6). Además, existen ciertos parámetros como la edad de diagnóstico, la localización del tumor, la extensión de la extirpación de la masa tumoral mediante cirugía, el estado funcional del paciente y los tratamientos con radio y/o quimioterapia, que modifican el pronóstico de los astrocitomas (9, 16, 18, 22, 352). Sin embargo, estos factores no son suficientes para predecir la evolución de determinados pacientes y algunos tumores presentan un comportamiento inesperadamente menos agresivo que otros tumores del mismo grado, independientemente de la intervención terapéutica, lo que puede deberse en parte a la elevada heterogeneidad biológica y genética de estos tumores (25). En este contexto, recientemente se han descrito distintos marcadores genéticos y moleculares que determinan el pronóstico y la respuesta terapéutica de los astrocitomas (32, 33, 98, 353, 354).

En nuestro trabajo hemos identificado diferentes alteraciones moleculares que modifican la supervivencia de los astrocitomas de alto grado. Los análisis univariante y multivariante han demostrado que la expresión de *VRK2*, la presencia de mutaciones en el gen *PTEN*, la expresión de *MSH6*, la edad de los pacientes y el tratamiento con radio y/o quimioterapia son factores pronóstico independientes en este grupo de pacientes. Sin embargo, en el análisis multivariante no obtuvimos significación en las variables expresión de *EGFRvIII*, expresión de *HDAC3* y mutaciones en los genes *IDH1/IDH2*. La expresión de *EGFRvIII* así como la de *HDAC3* son factores con un significado clínico dudoso y contradictorio (227, 262, 263, 347); sin embargo las mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* se consideran un factor pronóstico independientemente del grado de malignidad del tumor (32, 138), por lo que la ausencia de relación podría deberse a la baja frecuencia de mutaciones en los tumores de alto grado y al tamaño de muestra analizado.

Con las cinco variables altamente relacionadas con la supervivencia de los tumores de alto grado elaboramos un índice pronóstico que clasifica los pacientes en tres grupos de riesgo y nos permite predecir de manera sencilla e individualizada el pronóstico de los pacientes. De esta manera, aquellos pacientes con astrocitomas de alto grado con una edad de diagnóstico inferior a los 60 años, que recibieran tratamiento con radio y quimioterapia, que expresaran VRK2, que no presentaran mutaciones en el gen *PTEN* y con ausencia de expresión de MSH6 tendrían una supervivencia significativamente mayor que otros pacientes sin alguna de estas características. Observamos que la mediana de supervivencia en el grupo de los tumores de bajo riesgo fue de 18.8 meses, significativamente mayor que lo establecido hasta el momento para los astrocitomas de alto grado y, además, casi el 23% de los pacientes estaba vivo a los 3 años del diagnóstico.

La edad, el tratamiento y las mutaciones en *PTEN* como factores pronóstico independientes en estos pacientes se encuentran ampliamente descritos en la literatura (22, 35, 352). Sin embargo, en este trabajo describimos por primera vez la importancia de las proteínas VRK2 y MSH6 en la supervivencia de los pacientes con astrocitomas de alto grado, aunque sería necesaria otra serie independiente de pacientes para confirmar nuestros resultados.

En resumen, en nuestro trabajo confirmamos la gran variabilidad genética de los astrocitomas, y cómo el estudio molecular permite profundizar en el conocimiento de las causas de estos tumores y aplicar estos hallazgos en el pronóstico y tratamiento de los mismos.

CONCLVSiONES

1. El perfil genético caracterizado en nuestro trabajo permite discriminar los astrocitomas de alto grado en tres grupos, confirmando que los subtipos Clásico, Mesenquimal y Proneural propuestos por la nueva clasificación molecular de los astrocitomas predicen mejor el comportamiento y el pronóstico de estos pacientes que los criterios histológicos clásicos.
2. Nuestros resultados muestran que los mecanismos de reparación del DNA por escisión de nucleótidos y de emparejamientos erróneos modifican el riesgo a desarrollar astrocitomas. Esta observación, junto con el elevado número de tumores portadores de alteraciones somáticas en el sistema de reparación de emparejamientos erróneos, demuestran la importancia de estos sistemas en la patogénesis de los astrocitomas y los convierten en posibles dianas de terapias individualizadas.
3. La ausencia de relación entre la expresión de las proteínas MMR, la presencia de mutaciones en los genes MMR y la inestabilidad de microsatélites, así como el perfil de marcadores microsatélites inestables, sugiere que la inactivación del sistema de reparación de emparejamientos erróneos en astrocitomas tiene lugar por mecanismos diferentes a lo establecido en cáncer de colon.
4. La expresión de MLH1 se encuentra regulada por mecanismos epigenéticos en astrocitomas, como lo demuestra la asociación del genotipo AA del polimorfismo c.-93G>A de la región promotora con una metilación específica del promotor y la consiguiente pérdida de expresión de la proteína.
5. Las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 muestran una expresión elevada en los astrocitomas y, además, la presencia de células reactivas que expresan HDAC2, principalmente en los astrocitomas de bajo grado, sugiere que estas células podrían modificar el comportamiento de estos tumores.
6. Proponemos un índice pronóstico para los pacientes con astrocitomas de alto grado que incluye la edad de diagnóstico, el tratamiento con radio y quimioterapia, la expresión de VRK2, la presencia de mutaciones en el gen *PTEN* y la expresión de MSH6. Este índice muestra por primera vez que la expresión de las proteínas VRK2 y MSH6 son factores pronóstico independientes para la supervivencia de estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zhu Y, Parada LF. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:616-26.
2. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008;359:492-507.
3. Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet*. 2001;2:120-9.
4. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:425-36.
5. Stiles CD, Rowitch DH. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron*. 2008;58:832-46.
6. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114:97-109.
7. Globocan 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. Lyon, France: IARC Press; 2010.
8. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2005;109:93-108.
9. Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, et al. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*. 2008;113:1953-68.
10. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin*. 2007;25:867-90, vii.
11. Neglia JP, Robison LL, Stovall M, Liu Y, Packer RJ, Hammond S, et al. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:1528-37.
12. Group IS. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int J Epidemiol*. 2010;39:675-94.
13. Melean G, Sestini R, Ammannati F, Papi L. Genetic insights into familial tumors of the nervous system. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004;129C:74-84.
14. Kyritsis AP, Bondy ML, Rao JS, Sioka C. Inherited predisposition to glioma. *Neuro Oncol*. 2010;12:104-13.
15. Farrell CJ, Plotkin SR. Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurol Clin*. 2007;25:925-46, viii.
16. Ricard D, Idbaih A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. *Lancet*. 2012;379:1984-96.
17. 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-v49.

18. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64:479-89.
19. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* 2009;100:2235-41.
20. van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, Ben Hassel M, Schraub S, Hoang-Xuan K, et al. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet.* 2005;366:985-90.
21. Ricard D, Kaloshi G, Amiel-Benouaich A, Lejeune J, Marie Y, Mandonnet E, et al. Dynamic history of low-grade gliomas before and after temozolomide treatment. *Ann Neurol.* 2007;61:484-90.
22. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10:459-66.
23. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-96.
24. DeAngelis LM. Anaplastic glioma: how to prognosticate outcome and choose a treatment strategy. [corrected]. *J Clin Oncol.* 2009;27:5861-2.
25. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21:2683-710.
26. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170:1445-53.
27. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321:1807-12.
28. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006;2:494-503; quiz 1 p following 16.
29. Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP. Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res.* 2000;60:417-24.
30. Jeuken J, van den Broecke C, Gijzen S, Boots-Sprenger S, Wesseling P. RAS/RAF pathway activation in gliomas: the result of copy number gains rather than activating mutations. *Acta Neuropathol.* 2007;114:121-33.
31. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Backlund LM, Ichimura K, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008;68:8673-7.

32. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360:765-73.
33. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:319-31.
34. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol*. 2009;27:4150-4.
35. Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol*. 2002;4:196-211.
36. Baker SJ, McKinnon PJ. Tumour-suppressor function in the nervous system. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:184-96.
37. Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci*. 2009;16:748-54.
38. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455:1061-8.
39. Fulci G, Labuhn M, Maier D, Lachat Y, Hausmann O, Hegi ME, et al. p53 gene mutation and ink4a-arf deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma. *Oncogene*. 2000;19:3816-22.
40. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, 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.
41. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:997-1003.
42. Sadones J, Michotte A, Veld P, Chaskis C, Sciot R, Menten J, et al. MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma. *Eur J Cancer*. 2009;45:146-53.
43. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, 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.
44. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-6.
45. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:749-58.
46. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999;18:7621-36.
47. Okorokov AL, Orlova EV. Structural biology of the p53 tumour suppressor. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19:197-202.

48. el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1992;1:45-9.
49. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000;408:307-10.
50. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 2009;137:413-31.
51. Fuster JJ, Sanz-Gonzalez SM, Moll UM, Andres V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med.* 2007;13:192-9.
52. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:275-83.
53. Marine JC, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, Lozano G. Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ.* 2006;13:927-34.
54. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:909-23.
55. Riley MF, Lozano G. The Many Faces of MDM2 Binding Partners. *Genes Cancer.* 2012;3:226-39.
56. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:793-805.
57. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:402-12.
58. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993;75:817-25.
59. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1:a001883.
60. Lloyd AC. p53: only ARF the story. *Nat Cell Biol.* 2000;2:E48-50.
61. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:851-8.
62. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature.* 2009;458:1127-30.
63. Smith ML, Seo YR. p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis.* 2002;17:149-56.
64. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:594-604.
65. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a001008.
66. Yang A, McKeon F. P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:199-207.
67. Petitjean A, Hainaut P, Caron de Fromental C. TP63 gene in stress response and carcinogenesis: a broader role than expected. *Bull Cancer.* 2006;93:E126-35.

68. Mills AA. p63: oncogene or tumor suppressor? *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16:38-44.
69. Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res.* 2004;2:371-86.
70. Finlan LE, Hupp TR. p63: the phantom of the tumor suppressor. *Cell Cycle.* 2007;6:1062-71.
71. Melino G. p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. *Cell Death Differ.* 2011;18:1487-99.
72. Graziano V, De Laurenzi V. Role of p63 in cancer development. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1816:57-66.
73. Blanco S, Klimcakova L, Vega FM, Lazo PA. The subcellular localization of vaccinia-related kinase-2 (VRK2) isoforms determines their different effect on p53 stability in tumour cell lines. *FEBS J.* 2006;273:2487-504.
74. Lopez-Borges S, Lazo PA. The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. *Oncogene.* 2000;19:3656-64.
75. Nichols RJ, Traktman P. Characterization of three paralogous members of the Mammalian vaccinia related kinase family. *J Biol Chem.* 2004;279:7934-46.
76. Valbuena A, Lopez-Sanchez I, Vega FM, Sevilla A, Sanz-Garcia M, Blanco S, et al. Identification of a dominant epitope in human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and detection of different intracellular subpopulations. *Arch Biochem Biophys.* 2007;465:219-26.
77. Nezu J, Oku A, Jones MH, Shimane M. Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics.* 1997;45:327-31.
78. Valbuena A, Sanz-Garcia M, Lopez-Sanchez I, Vega FM, Lazo PA. Roles of VRK1 as a new player in the control of biological processes required for cell division. *Cell Signal.* 2011;23:1267-72.
79. Vega FM, Sevilla A, Lazo PA. p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1. *Mol Cell Biol.* 2004;24:10366-80.
80. Valbuena A, Castro-Obregon S, Lazo PA. Downregulation of VRK1 by p53 in response to DNA damage is mediated by the autophagic pathway. *PLoS One.* 2011;6:e17320.
81. Klerkx EP, Lazo PA, Askjaer P. Emerging biological functions of the vaccinia-related kinase (VRK) family. *Histol Histopathol.* 2009;24:749-59.
82. Blanco S, Santos C, Lazo PA. Vaccinia-related kinase 2 modulates the stress response to hypoxia mediated by TAK1. *Mol Cell Biol.* 2007;27:7273-83.
83. Blanco S, Sanz-Garcia M, Santos CR, Lazo PA. Modulation of interleukin-1 transcriptional response by the interaction between VRK2 and the JIP1 scaffold protein. *PLoS One.* 2008;3:e1660.

84. Fernandez IF, Blanco S, Lozano J, Lazo PA. VRK2 inhibits mitogen-activated protein kinase signaling and inversely correlates with ErbB2 in human breast cancer. *Mol Cell Biol.* 2010;30:4687-97.
85. Valbuena A, Blanco S, Vega FM, Lazo PA. The C/H3 domain of p300 is required to protect VRK1 and VRK2 from their downregulation induced by p53. *PLoS One.* 2008;3:e2649.
86. Santos CR, Rodriguez-Pinilla M, Vega FM, Rodriguez-Peralto JL, Blanco S, Sevilla A, et al. VRK1 signaling pathway in the context of the proliferation phenotype in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res.* 2006;4:177-85.
87. Valbuena A, Suarez-Gauthier A, Lopez-Rios F, Lopez-Encuentra A, Blanco S, Fernandez PL, et al. Alteration of the VRK1-p53 autoregulatory loop in human lung carcinomas. *Lung Cancer.* 2007;58:303-9.
88. Finetti P, Cervera N, Charafe-Jauffret E, Chabannon C, Charpin C, Chaffanet M, et al. Sixteen-kinase gene expression identifies luminal breast cancers with poor prognosis. *Cancer Res.* 2008;68:767-76.
89. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:361-70.
90. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 2003;12:541-52.
91. Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen MT, Poulsen HS. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal.* 2007;19:2013-23.
92. Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell.* 2006;125:1137-49.
93. Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J.* 2010;277:301-8.
94. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget.* 2011;2:135-64.
95. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:553-63.
96. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:2965-9.
97. Aldape KD, Ballman K, Furth A, Buckner JC, Giannini C, Burger PC, et al. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63:700-7.
98. Mellingshoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med.* 2005;353:2012-24.

99. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002;296:1655-7.
100. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7:606-19.
101. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008;27:5497-510.
102. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:921-9.
103. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:489-501.
104. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12:21-35.
105. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129:1261-74.
106. Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17:71-7.
107. Liliental J, Moon SY, Lesche R, Mamillapalli R, Li D, Zheng Y, et al. Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr Biol*. 2000;10:401-4.
108. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304:554.
109. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. 2007;113:295-302.
110. Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, et al. The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science*. 2007;318:1744-8.
111. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997;275:1943-7.
112. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*. 1997;15:356-62.
113. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:283-96.
114. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell*. 2008;133:403-14.
115. Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol*. 2004;22:2954-63.
116. Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene*. 2008;27:5443-53.

117. Vivanco I, Palaskas N, Tran C, Finn SP, Getz G, Kennedy NJ, et al. Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*. 2007;11:555-69.
118. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*. 2007;128:157-70.
119. Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breysens H, Bisso A, et al. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat Genet*. 2006;38:1133-41.
120. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005;436:725-30.
121. Niaux TS, Baccarini M. Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2010;31:1165-74.
122. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:875-85.
123. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6:313-9.
124. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949-54.
125. Korshunov A, Meyer J, Capper D, Christians A, Remke M, Witt H, et al. Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathol*. 2009;118:401-5.
126. Schiffman JD, Hodgson JG, VandenBerg SR, Flaherty P, Polley MY, Yu M, et al. Oncogenic BRAF mutation with CDKN2A inactivation is characteristic of a subset of pediatric malignant astrocytomas. *Cancer Res*. 2010;70:512-9.
127. Palanisamy N, Ateeq B, Kalyana-Sundaram S, Pflueger D, Ramnarayanan K, Shankar S, et al. Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma. *Nat Med*. 2010;16:793-8.
128. Lin A, Rodriguez FJ, Karajannis MA, Williams SC, Legault G, Zagzag D, et al. BRAF alterations in primary glial and glioneuronal neoplasms of the central nervous system with identification of 2 novel KIAA1549:BRAF fusion variants. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71:66-72.
129. Forshew T, Tatevossian RG, Lawson AR, Ma J, Neale G, Ogunkolade BW, et al. Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. *J Pathol*. 2009;218:172-81.
130. Jacob K, Quang-Khuong DA, Jones DT, Witt H, Lambert S, Albrecht S, et al. Genetic aberrations leading to MAPK pathway activation mediate oncogene-induced senescence in sporadic pilocytic astrocytomas. *Clin Cancer Res*. 2011;17:4650-60.
131. Raabe EH, Lim KS, Kim JM, Meeker A, Mao XG, Nikkhah G, et al. BRAF activation induces transformation and then senescence in human neural stem cells: a pilocytic astrocytoma model. *Clin Cancer Res*. 2011;17:3590-9.

132. Geisbrecht BV, Gould SJ. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1999;274:30527-33.
133. Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Palma JM, Lupianez JA, del Rio LA. Peroxisomal NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. Characterization and Activity Regulation during Natural Senescence. *Plant Physiol.* 1999;121:921-8.
134. Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med.* 2010;16:387-97.
135. Xu X, Zhao J, Xu Z, Peng B, Huang Q, Arnold E, et al. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J Biol Chem.* 2004;279:33946-57.
136. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009;462:739-44.
137. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science.* 2009;324:261-5.
138. Kloosterhof NK, Bralten LB, Dubbink HJ, French PJ, van den Bent MJ. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? *Lancet Oncol.* 2011;12:83-91.
139. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Seo SI, et al. Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer.* 2009;125:353-5.
140. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med.* 2009;361:1058-66.
141. Park SW, Chung NG, Han JY, Eom HS, Lee JY, Yoo NJ, et al. Absence of IDH2 codon 172 mutation in common human cancers. *Int J Cancer.* 2009;125:2485-6.
142. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, 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.
143. Borodovsky A, Seltzer MJ, Riggins GJ. Altered cancer cell metabolism in gliomas with mutant IDH1 or IDH2. *Curr Opin Oncol.* 2012;24:83-9.
144. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 2010;18:553-67.
145. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature.* 2012;483:474-8.
146. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009;461:1071-8.

147. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 2003;193:3-34.
148. Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res*. 2008;18:64-72.
149. Fousteri M, Mullenders LH. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res*. 2008;18:73-84.
150. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:22-33.
151. Kamileri I, Karakasilioti I, Garinis GA. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet*. 2012;28:566-73.
152. Fromme JC, Verdine GL. Base excision repair. *Adv Protein Chem*. 2004;69:1-41.
153. Mol CD, Hosfield DJ, Tainer JA. Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat Res*. 2000;460:211-29.
154. Fortini P, Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6:398-409.
155. Kim YJ, Wilson DM, 3rd. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5:3-13.
156. O'Driscoll M, Jeggo PA. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet*. 2006;7:45-54.
157. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*. 2008;18:134-47.
158. West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:435-45.
159. Li X, Heyer WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*. 2008;18:99-113.
160. Weterings E, Chen DJ. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res*. 2008;18:114-24.
161. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev*. 2006;106:302-23.
162. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 2008;18:85-98.
163. Pena-Diaz J, Jiricny J. Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? *Trends Biochem Sci*. 2012;37:206-14.
164. Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:681-710.

165. Lamers MH, Perrakis A, Enzlin JH, Winterwerp HH, de Wind N, Sixma TK. The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. *Nature*. 2000;407:711-7.
166. Warren JJ, Pohlhaus TJ, Changela A, Iyer RR, Modrich PL, Beese LS. Structure of the human MutS α DNA lesion recognition complex. *Mol Cell*. 2007;26:579-92.
167. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:335-46.
168. Constantin N, Dzantiev L, Kadyrov FA, Modrich P. Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction. *J Biol Chem*. 2005;280:39752-61.
169. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:261-8.
170. Kastrinos F, Syngal S. Screening Patients With Colorectal Cancer for Lynch Syndrome: What Are We Waiting For? *J Clin Oncol*. 2012.
171. Koornstra JJ, Mourits MJ, Sijmons RH, Leliveld AM, Hollema H, Kleibeuker JH. Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome. *Lancet Oncol*. 2009;10:400-8.
172. Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, Bernstein I, Aarnio M, Jarvinen HJ, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer*. 2008;123:444-9.
173. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009;76:1-18.
174. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:769-80.
175. Peltomaki P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer*. 2005;4:227-32.
176. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58:5248-57.
177. Allan JM, Shorto J, Adlard J, Bury J, Coggins R, George R, et al. MLH1 - 93G>A promoter polymorphism and risk of mismatch repair deficient colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2008;123:2456-9.
178. Mrkonjic M, Roslin NM, Greenwood CM, Raptis S, Pollett A, Laird PW, et al. Specific variants in the MLH1 gene region may drive DNA methylation, loss of protein expression, and MSI-H colorectal cancer. *PLoS One*. 2010;5:e13314.
179. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28:1057-68.
180. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet*. 2007;16 Spec No 1:R50-9.

181. Lopez-Serra L, Esteller M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer*. 2008;98:1881-5.
182. Straub T, Becker PB. Dosage compensation: the beginning and end of generalization. *Nat Rev Genet*. 2007;8:47-57.
183. Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16:564-71.
184. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007;8:286-98.
185. Alelu-Paz R, Ashour N, Gonzalez-Corpas A, Ropero S. DNA methylation, histone modifications, and signal transduction pathways: a close relationship in malignant gliomas pathophysiology. *J Signal Transduct*. 2012;2012:956958.
186. Martinez R, Esteller M. The DNA methylome of glioblastoma multiforme. *Neurobiol Dis*. 2010;39:40-6.
187. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:296-307.
188. Balana C, Carrato C, Ramirez JL, Cardona AF, Berdiel M, Sanchez JJ, et al. Tumour and serum MGMT promoter methylation and protein expression in glioblastoma patients. *Clin Transl Oncol*. 2011;13:677-85.
189. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128:693-705.
190. Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet*. 2008;40:897-903.
191. Karlic 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.
192. Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:371832.
193. Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*. 2007;26:5420-32.
194. Gregoretta IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*. 2004;338:17-31.
195. Kazantsev AG, Thompson LM. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:854-68.
196. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol*. 2007;1:19-25.
197. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:38-51.

-
198. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215-33.
199. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:199-227.
200. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004;14:1902-10.
201. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-97.
202. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;11:228-34.
203. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9:102-14.
204. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435:834-8.
205. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle*. 2008;7:2643-6.
206. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*. 2005;353:1768-71.
207. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-9.
208. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
209. Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10325-9.
210. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat*. 2001;17:439-74.
211. Oda S, Oki E, Maehara Y, Sugimachi K. Precise assessment of microsatellite instability using high resolution fluorescent microsatellite analysis. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3415-20.
212. Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, Errami A, Sijben A, et al. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest*. 2007;87:1055-65.
213. Capel E, Flejou JF, Hamelin R. Assessment of MLH1 promoter methylation in relation to gene expression requires specific analysis. *Oncogene*. 2007;26:7596-600.

214. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
215. Parmar MKB, Machin D. *Survival analysis: A practical approach*. Chichester, England; 1995.
216. Vicente Villardón JL. MULTBILOT: A package for Multivariate Analysis using Biplots. Departamento de Estadística. Universidad de Salamanca. (<http://biplot.usal.es/multbiplot>); 2010.
217. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22:1928-9.
218. Nader L, Colli BO, Machado HR, Carlotti CG, Jr., Santos AC, Chimelli L. MIB-1 labeling index in astrocytic tumors--a clinicopathologic study. *Clin Neuropathol*. 2004;23:262-70.
219. Raghavan R, Steart PV, Weller RO. Cell proliferation patterns in the diagnosis of astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme: a Ki-67 study. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1990;16:123-33.
220. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007;28:622-9.
221. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*. 1999;99:323-34.
222. Berntsson SG, Wibom C, Sjostrom S, Henriksson R, Brannstrom T, Broholm H, et al. Analysis of DNA repair gene polymorphisms and survival in low-grade and anaplastic gliomas. *J Neurooncol*. 2011;105:531-8.
223. Lee KM, Choi JY, Kang C, Kang CP, Park SK, Cho H, et al. Genetic polymorphisms of selected DNA repair genes, estrogen and progesterone receptor status, and breast cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2005;11:4620-6.
224. Park SH, Lee GY, Jeon HS, Lee SJ, Kim KM, Jang SS, et al. -93G-->A polymorphism of hMLH1 and risk of primary lung cancer. *Int J Cancer*. 2004;112:678-82.
225. McKean-Cowdin R, Barnholtz-Sloan J, Inskip PD, Ruder AM, Butler M, Rajaraman P, et al. Associations between polymorphisms in DNA repair genes and glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:1118-26.
226. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005;50:427-34.
227. Weichert W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett*. 2009;280:168-76.
228. Kurtkaya-Yapicier O, Scheithauer BW, Hebrink D, James CD. p53 in nonneoplastic central nervous system lesions: an immunohistochemical and genetic sequencing study. *Neurosurgery*. 2002;51:1246-54; discussion 54-5.

229. Pardo FS, Hsu DW, Zeheb R, Efird JT, Okunieff PG, Malkin DM. Mutant, wild type, or overall p53 expression: freedom from clinical progression in tumours of astrocytic lineage. *Br J Cancer*. 2004;91:1678-86.
230. Robles AI, Harris CC. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:a001016.
231. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387:296-9.
232. Kraus A, Neff F, Behn M, Schuermann M, Muenkel K, Schlegel J. Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild-type p53 protein in human glioblastoma cells. *Int J Cancer*. 1999;80:930-4.
233. Bargonetti J, Friedman PN, Kern SE, Vogelstein B, Prives C. Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell*. 1991;65:1083-91.
234. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol*. 2001;75:4283-96.
235. Levidou G, El-Habr E, Saetta AA, Bamias C, Katsouyanni K, Patsouris E, et al. P53 immunoexpression as a prognostic marker for human astrocytomas: a meta-analysis and review of the literature. *J Neurooncol*. 2010;100:363-71.
236. Nieder C, Petersen S, Petersen C, Thames HD. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in gliomas. *Cancer Treat Rev*. 2000;26:67-73.
237. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M, 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.
238. Kim YH, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, et al. Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. *Am J Pathol*. 2010;177:2708-14.
239. Joerger AC, Fersht AR. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*. 2007;26:2226-42.
240. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68:820-3.
241. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:701-13.
242. Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*. 1997;15:887-98.
243. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*. 2003;33:357-65.
244. Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer*. 2004;108:196-9.

245. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:95-107.
246. Rajaraman P, Wang SS, Rothman N, Brown MM, Black PM, Fine HA, et al. Polymorphisms in apoptosis and cell cycle control genes and risk of brain tumors in adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16:1655-61.
247. Wang LE, Bondy ML, Shen H, El-Zein R, Aldape K, Cao Y, et al. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of glioma. *Cancer Res*. 2004;64:5560-3.
248. Malmer B, Feychting M, Lonn S, Ahlbom A, Henriksson R. p53 Genotypes and risk of glioma and meningioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:2220-3.
249. Parhar P, Ezer R, Shao Y, Allen JC, Miller DC, Newcomb EW. Possible association of p53 codon 72 polymorphism with susceptibility to adult and pediatric high-grade astrocytomas. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;137:98-103.
250. Lima-Ramos V, Pacheco-Figueiredo L, Costa S, Pardal F, Silva A, Amorim J, et al. TP53 codon 72 polymorphism in susceptibility, overall survival, and adjuvant therapy response of gliomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;180:14-9.
251. Shi M, Huang R, Pei C, Jia X, Jiang C, Ren H. TP53 codon 72 polymorphism and glioma risk: A meta-analysis. *Oncol Lett*. 2012;3:599-606.
252. King KE, Weinberg WC. p63: defining roles in morphogenesis, homeostasis, and neoplasia of the epidermis. *Mol Carcinog*. 2007;46:716-24.
253. Barbieri CE, Barton CE, Pietenpol JA. Delta Np63 alpha expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Biol Chem*. 2003;278:51408-14.
254. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, et al. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2008;26:3015-24.
255. Fernandez IF, Perez-Rivas LG, Blanco S, Castillo-Dominguez AA, Lozano J, Lazo PA. VRK2 anchors KSR1-MEK1 to endoplasmic reticulum forming a macromolecular complex that compartmentalizes MAPK signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69:3881-93.
256. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:1246-56.
257. Barber TD, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *N Engl J Med*. 2004;351:2883.
258. Marie Y, Carpentier AF, Omuro AM, Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K, et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations in human gliomas. *Neurology*. 2005;64:1444-5.
259. Mimeault M, Batra SK. Complex oncogenic signaling networks regulate brain tumor-initiating cells and their progenies: pivotal roles of wild-type EGFR, EGFRvIII mutant and hedgehog cascades and novel multitargeted therapies. *Brain Pathol*. 2011;21:479-500.

260. Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, Crosby K, Seligson D, Palotie A, et al. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer Res.* 2003;63:2742-6.
261. Li B, Yuan M, Kim IA, Chang CM, Bernhard EJ, Shu HK. Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene.* 2004;23:4594-602.
262. Montano N, Cenci T, Martini M, D'Alessandris QG, Pelacchi F, Ricci-Vitiani L, et al. Expression of EGFRvIII in glioblastoma: prognostic significance revisited. *Neoplasia.* 2011;13:1113-21.
263. Heimberger AB, Hlatky R, Suki D, Yang D, Weinberg J, Gilbert M, et al. Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1462-6.
264. Pelloski CE, Ballman KV, Furth AF, Zhang L, Lin E, Sulman EP, et al. Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2007;25:2288-94.
265. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 2003;63:6962-70.
266. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.* 1995;55:5536-9.
267. Okamoto I, Kenyon LC, Emlet DR, Mori T, Sasaki J, Hirosako S, et al. Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2003;94:50-6.
268. Broderick DK, Di C, Parrett TJ, Samuels YR, Cummins JM, McLendon RE, et al. Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res.* 2004;64:5048-50.
269. Hartmann C, Bartels G, Gehlhaar C, Holtkamp N, von Deimling A. PIK3CA mutations in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 2005;109:639-42.
270. Gallia GL, Rand V, Siu IM, Eberhart CG, James CD, Marie SK, et al. PIK3CA gene mutations in pediatric and adult glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Res.* 2006;4:709-14.
271. Mueller W, Mizoguchi M, Silen E, D'Amore K, Nutt CL, Louis DN. Mutations of the PIK3CA gene are rare in human glioblastoma. *Acta Neuropathol.* 2005;109:654-5.
272. Gymnopoulos M, Elsliger MA, Vogt PK. Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:5569-74.
273. Lino MM, Merlo A. PI3Kinase signaling in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2011;103:417-27.

274. Alimonti A, Carracedo A, Clohessy JG, Trotman LC, Nardella C, Egia A, et al. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet.* 2010;42:454-8.
275. Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet.* 2002;70:829-44.
276. Ermoian RP, Furniss CS, Lamborn KR, Basila D, Berger MS, Gottschalk AR, et al. Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. *Clin Cancer Res.* 2002;8:1100-6.
277. Srividya MR, Thota B, Shailaja BC, Arivazhagan A, Thennarasu K, Chandramouli BA, et al. Homozygous 10q23/PTEN deletion and its impact on outcome in glioblastoma: a prospective translational study on a uniformly treated cohort of adult patients. *Neuropathology.* 2011;31:376-83.
278. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2011;121:397-405.
279. 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.
280. Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res.* 2001;61:6674-8.
281. Inda M, Fan X, Munoz J, Perot C, Fauvet D, Danglot G, et al. Chromosomal abnormalities in human glioblastomas: gain in chromosome 7p correlating with loss in chromosome 10q. *Mol Carcinog.* 2003;36:6-14.
282. Tortosa A, Vinolas N, Villa S, Verger E, Gil JM, Brell M, et al. Prognostic implication of clinical, radiologic, and pathologic features in patients with anaplastic gliomas. *Cancer.* 2003;97:1063-71.
283. Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z, Horvath S, Cloughesy T, Liao LM, et al. Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Res.* 2004;64:6503-10.
284. Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, et al. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res.* 2003;63:1602-7.
285. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, 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.
286. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:1513-30.
287. Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. ERCC1 polymorphism is associated with differential ERCC1 gene expression. *Proc AACR.* 2002;93:1591.

288. Zhang N, Lin LY, Zhu LL, Wu F, Wen H, Pan D, et al. ERCC1 polymorphisms and risk of adult glioma in a Chinese population: a hospital-based case-control study. *Cancer Invest.* 2012;30:199-202.
289. Gao R, Reece K, Sissung T, Reed E, Price DK, Figg WD. The ERCC1 N118N polymorphism does not change cellular ERCC1 protein expression or platinum sensitivity. *Mutat Res.* 2011;708:21-7.
290. Wei HB, Lu XS, Shang LH, Xu G, Hu J, Che DH, et al. Polymorphisms of ERCC1 C118T/C8092A and MDR1 C3435T predict outcome of platinum-based chemotherapies in advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Arch Med Res.* 2011;42:412-20.
291. Zhang L, Wang J, Xu L, Zhou J, Guan X, Jiang F, et al. Nucleotide excision repair gene ERCC1 polymorphisms contribute to cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mutagenesis.* 2012;27:67-76.
292. Li Y, Gu S, Wu Q, Fu X, Mao Y, Huang Y, et al. No association of ERCC1 C8092A and T19007C polymorphisms to cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:967-73.
293. Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect.* 2003;111:1843-50.
294. Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis.* 2001;22:1437-45.
295. Caggana M, Kilgallen J, Conroy JM, Wiencke JK, Kelsey KT, Miike R, et al. Associations between ERCC2 polymorphisms and gliomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:355-60.
296. Liu Y, Scheurer ME, El-Zein R, Cao Y, Do KA, Gilbert M, et al. Association and interactions between DNA repair gene polymorphisms and adult glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:204-14.
297. Rajaraman P, Hutchinson A, Wichner S, Black PM, Fine HA, Loeffler JS, et al. DNA repair gene polymorphisms and risk of adult meningioma, glioma, and acoustic neuroma. *Neuro Oncol.* 2010;12:37-48.
298. Wrensch M, Kelsey KT, Liu M, Miike R, Moghadassi M, Sison JD, et al. ERCC1 and ERCC2 polymorphisms and adult glioma. *Neuro Oncol.* 2005;7:495-507.
299. Chen DQ, Yao DX, Zhao HY, Yang SJ. DNA repair gene ERCC1 and XPD polymorphisms predict glioma susceptibility and prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13:2791-4.
300. Dabholkar MD, Berger MS, Vionnet JA, Egwuagu C, Silber JR, Yu JJ, et al. Malignant and nonmalignant brain tissues differ in their messenger RNA expression patterns for ERCC1 and ERCC2. *Cancer Res.* 1995;55:1261-6.
301. Liang BC, Ross DA, Reed E. Genomic copy number changes of DNA repair genes ERCC1 and ERCC2 in human gliomas. *J Neurooncol.* 1995;26:17-23.

302. Patel A, van Meyel DJ, Mohapatra G, Bollen A, Wrensch M, Cairncross JG, et al. Gliomas in families: chromosomal analysis by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998;100:77-83.
303. Smith JS, Alderete B, Minn Y, Borell TJ, Perry A, Mohapatra G, et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene.* 1999;18:4144-52.
304. Hadi MZ, Coleman MA, Fidelis K, Mohrenweiser HW, Wilson DM, 3rd. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:3871-9.
305. Ginsberg G, Angle K, Guyton K, Sonawane B. Polymorphism in the DNA repair enzyme XRCC1: utility of current database and implications for human health risk assessment. *Mutat Res.* 2011;727:1-15.
306. Kiuru A, Lindholm C, Heinavaara S, Ilus T, Jokinen P, Haapasalo H, et al. XRCC1 and XRCC3 variants and risk of glioma and meningioma. *J Neurooncol.* 2008;88:135-42.
307. Jacobs DI, Bracken MB. Association between XRCC1 polymorphism 399 G->A and glioma among Caucasians: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2012;13:97.
308. Jiang L, Fang X, Bao Y, Zhou JY, Shen XY, Ding MH, et al. Association between the XRCC1 Polymorphisms and Glioma Risk: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *PLoS One.* 2013;8:e55597.
309. Wei X, Chen D, Lv T. A functional polymorphism in XRCC1 is associated with glioma risk: evidence from a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2013;40:567-72.
310. Custodio AC, Almeida LO, Pinto GR, Santos MJ, Almeida JR, Clara CA, et al. Variation in DNA repair gene XRCC3 affects susceptibility to astrocytomas and glioblastomas. *Genet Mol Res.* 2012;11:332-9.
311. Liu HB, Peng YP, Dou CW, Su XL, Gao NK, Tian FM, et al. Comprehensive study on associations between nine SNPs and glioma risk. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13:4905-8.
312. Manuguerra M, Saletta F, Karagas MR, Berwick M, Veglia F, Vineis P, et al. XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2006;164:297-302.
313. Winsey SL, Haldar NA, Marsh HP, Bunce M, Marshall SE, Harris AL, et al. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res.* 2000;60:5612-6.
314. Qian B, Zhang H, Zhang L, Zhou X, Yu H, Chen K. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk. *Lung Cancer.* 2011;73:138-46.
315. Smith TR, Miller MS, Lohman K, Lange EM, Case LD, Mohrenweiser HW, et al. Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett.* 2003;190:183-90.

316. Jacobsen NR, Raaschou-Nielsen O, Nexø B, Wallin H, Overvad K, Tjønneland A, et al. XRCC3 polymorphisms and risk of lung cancer. *Cancer Lett.* 2004;213:67-72.
317. Arita M, Zhong X, Min Z, Hemmi H, Shimatake H. Multiple sites required for expression in 5'-flanking region of the hMLH1 gene. *Gene.* 2003;306:57-65.
318. Ito E, Yanagisawa Y, Iwahashi Y, Suzuki Y, Nagasaki H, Akiyama Y, et al. A core promoter and a frequent single-nucleotide polymorphism of the mismatch repair gene hMLH1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256:488-94.
319. Rass K, Gutwein P, Welter C, Meineke V, Tilgen W, Reichrath J. DNA mismatch repair enzyme hMSH2 in malignant melanoma: increased immunoreactivity as compared to acquired melanocytic nevi and strong mRNA expression in melanoma cell lines. *Histochem J.* 2001;33:459-67.
320. Srivastava T, Chattopadhyay P, Mahapatra AK, Sarkar C, Sinha S. Increased hMSH2 protein expression in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2004;66:51-7.
321. Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res.* 1999;59:2029-33.
322. Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, et al. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer.* 2011;129:659-70.
323. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:6870-5.
324. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene.* 1998;17:2413-7.
325. Nagasaka T, Rhee J, Kloor M, Gebert J, Naomoto Y, Boland CR, et al. Somatic hypermethylation of MSH2 is a frequent event in Lynch Syndrome colorectal cancers. *Cancer Res.* 2010;70:3098-108.
326. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet.* 2009;41:112-7.
327. Chen H, Taylor NP, Sotamaa KM, Mutch DG, Powell MA, Schmidt AP, et al. Evidence for heritable predisposition to epigenetic silencing of MLH1. *Int J Cancer.* 2007;120:1684-8.
328. Eckert A, Kloor M, Giersch A, Ahmadi R, Herold-Mende C, Hampl JA, et al. Microsatellite instability in pediatric and adult high-grade gliomas. *Brain Pathol.* 2007;17:146-50.
329. Martinez R, Schackert HK, Appelt H, Plaschke J, Baretton G, Schackert G. Low-level microsatellite instability phenotype in sporadic glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131:87-93.

330. Viana-Pereira M, Lee A, Popov S, Bax DA, Al-Sarraj S, Bridges LR, et al. Microsatellite instability in pediatric high grade glioma is associated with genomic profile and differential target gene inactivation. *PLoS One*. 2011;6:e20588.
331. Shah SN, Hile SE, Eckert KA. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. *Cancer Res*. 2010;70:431-5.
332. Alldinger I, Schaefer KL, Goedde D, Ottaviano L, Dirksen U, Ranft A, et al. Microsatellite instability in Ewing tumor is not associated with loss of mismatch repair protein expression. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007;133:749-59.
333. Viana-Pereira M, Almeida I, Sousa S, Mahler-Araujo B, Seruca R, Pimentel J, et al. Analysis of microsatellite instability in medulloblastoma. *Neuro Oncol*. 2009;11:458-67.
334. Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res*. 1997;57:300-3.
335. Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL, et al. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4622-9.
336. Maxwell JA, Johnson SP, McLendon RE, Lister DW, Horne KS, Rasheed A, et al. Mismatch repair deficiency does not mediate clinical resistance to temozolomide in malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4859-68.
337. Lanza G, Gafa R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006;24:2359-67.
338. Ohrling K, Edler D, Hallstrom M, Ragnhammar P. Mismatch repair protein expression is an independent prognostic factor in sporadic colorectal cancer. *Acta Oncol*. 2010;49:797-804.
339. Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res*. 2000;462:83-100.
340. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 1999;59:793-7.
341. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*. 2001;22:1715-9.
342. Jesien-Lewandowicz E, Jesionek-Kupnicka D, Zawlik I, Szybka M, Kulczycka-Wojdala D, Rieske P, et al. High incidence of MGMT promoter methylation in primary glioblastomas without correlation with TP53 gene mutations. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009;188:77-82.
343. Groenendijk FH, Taal W, Dubbink HJ, Haarloo CR, Kouwenhoven MC, van den Bent MJ, et al. MGMT promoter hypermethylation is a frequent, early, and

- consistent event in astrocytoma progression, and not correlated with TP53 mutation. *J Neurooncol.* 2011;101:405-17.
344. Mellai M, Monzeglio O, Piazzini A, Caldera V, Annovazzi L, Cassoni P, et al. MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 350 brain tumors. *J Neurooncol.* 2012;107:617-31.
345. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4933-8.
346. Lucio-Eterovic AK, Cortez MA, Valera ET, Motta FJ, Queiroz RG, Machado HR, et al. Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer.* 2008;8:243.
347. Campos B, Bermejo JL, Han L, Felsberg J, Ahmadi R, Grabe N, et al. Expression of nuclear receptor corepressors and class I histone deacetylases in astrocytic gliomas. *Cancer Sci.* 2011;102:387-92.
348. Liby P, Kostrouchova M, Pohludka M, Yilma P, Hrabal P, Sikora J, et al. Elevated and deregulated expression of HDAC3 in human astrocytic glial tumours. *Folia Biol (Praha).* 2006;52:21-33.
349. Chuang DM, Leng Y, Marinova Z, Kim HJ, Chiu CT. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci.* 2009;32:591-601.
350. Sanai N, Chang S, Berger MS. Low-grade gliomas in adults. *J Neurosurg.* 2011;115:948-65.
351. MacDonald JL, Roskams AJ. Epigenetic regulation of nervous system development by DNA methylation and histone deacetylation. *Prog Neurobiol.* 2009;88:170-83.
352. Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham LD, Dorfman MV, Piscatelli N, et al. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:228-33.
353. The TCGA TRN. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455:1061-8.
354. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol.* 2010;6:39-51.