



TESIS DOCTORAL 2022

María González-Tablas Pimenta

**ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS
Y DEL MICROAMBIENTE INMUNE TUMORAL EN
PACIENTES CON GLIOBLASTOMA:**

IMPACTO EN EL CURSO CLÍNICO DEL TUMOR.

ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS Y DEL MICROAMBIENTE INMUNE TUMORAL EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA: IMPACTO EN EL CURSO CLÍNICO DEL TUMOR

María González-Tablas Pimenta

Directores:

Dr. Alberto Orfão de Matos Correia e Vale

Dra. María Dolores Taberero Redondo

TESIS DOCTORAL
2022





D. Alberto Orfão De Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por María González-Tablas Pimenta titulado "ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS Y DEL MICROAMBIENTE INMUNE TUMORAL EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA: IMPACTO EN EL CURSO CLÍNICO DEL TUMOR", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa "Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional" de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 27 de septiembre del año 2022.

Fdo: Dr. Alberto Orfão de Matos



Dña. María Dolores Tabernero Redondo, Doctora en Medicina y Cirugía

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por María González-Tablas Pimenta titulado “ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS Y DEL MICROAMBIENTE INMUNE TUMORAL EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA: IMPACTO EN EL CURSO CLÍNICO DEL TUMOR”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa “Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 27 de septiembre del año 2022.

Fdo: Dra. María Dolores Tabernero Redondo

La presente tesis doctoral incluye tres trabajos originales publicados en revistas científicas indexadas en el *Science Citation Reports*, que se enumeran a continuación:

1. Prognostic stratification of adult primary glioblastoma multiforme patients based on their tumor gene amplification profiles.

María González-Tablas¹, Inês Crespo^{2,3}, Ana Luísa Vital^{2,3}, Álvaro Otero⁴, Ana Belén Nieto⁵, Pablo Sousa⁴, María Carmen Patino-Alonso⁵, Luis Antonio Corchete⁶, Hermínio Tão⁷, Olinda Rebelo⁸, Marcos Barbosa^{7,9}, Maria Rosário Almeida², Ana Filipa Guedes², María Celeste Lopes^{2,3}, Pim J. French¹⁰, Alberto Orfao^{1,11*}, María Dolores Tabernero^{1,11*}

*Both authors have equally contributed to this work and should be considered as last authors.

Oncotarget. 2018 Jun 15;9(46):28083-28102. doi: 10.18632/oncotarget.25562.

IF: 3.710 (Q1)

2. Heterogeneous EGFR, CDK4, MDM4, and PDGFRA Gene Expression Profiles in Primary GBM: No Association with Patient Survival.

María González-Tablas^{1,11}, Daniel Arandia^{4,11}, María Jara-Acevedo^{11,12}, Álvaro Otero^{4,11}, Ana-Luisa Vital^{2,3}, Carlos Prieto^{11,13}, Nerea González-García^{11,14}, Ana Belén Nieto-Librero^{11,14}, Herminio Tao⁷, Daniel Pascual^{4,11}, Laura Ruiz^{4,11}, Pablo Sousa^{4,11}, Purificación Galindo-Villardón¹⁴, Alberto Orfao^{1,11,*} y María Dolores Tabernero^{1,11,15,*}

*Both authors have equally contributed to this work and should be considered as last authors

Cancers (Basel). 2020 Jan 17;12(1):231. doi: 10.3390/cancers12010231.

IF:6.126 (Q1)

3. Tumor cell and immune cell profiles in primary human glioblastoma: Impact on patient outcome.

María González-Tablas^{1,11}, Álvaro Otero MD^{4,11}, Daniel Arandia MD^{4,11}, Daniel Pascual MD^{4,11}, Laura Ruiz MD^{4,11}, Pablo Sousa MD^{4,11}, Andoni García MD^{4,11}, Juan Carlos Roa MD^{4,11}, Jorge Javier MD Villaseñor MD^{4,11}, Luis Torres MD^{4,11}, Maria do Rosário Almeida PhD², Javier Pedro Ortiz MD^{11,16}, Adelaida Nieto MD^{11,17}, Alberto Orfao MD, PhD^{1,11*}, María Dolores Tabernero MD, PhD^{1,11*}.

*Both authors have equally contributed to this manuscript, and both should be considered as last authors.

Brain Pathol. 2021 Mar;31(2):365-380. doi: 10.1111/bpa.12927.

IF:5.568 (Q1)

¹Cancer Research Center (IBMCC, USAL-CSIC), Department of Medicine, Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), University of Salamanca, Salamanca, Spain; ²Centre for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; ³Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Coimbra, Portugal;

⁴Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario e Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ⁵Department of Statistics, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁶servicio de Hematología, Hospital Universitario, IBSAL, IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain ⁷Neurosurgery Service, University Hospital of Coimbra, Coimbra, Portugal ⁸Neuropathology Laboratory, Neurology Service, University Hospital of Coimbra, Coimbra, Portugal ⁹Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal ¹⁰Department of Neurology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands ¹¹Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ¹²Sequencing DNA Service (NUCLEUS), University of Salamanca, Salamanca, Spain; ¹³ Bioinformatics Service (NUCLEUS), University of Salamanca, Salamanca, Spain; ¹⁴Department of Statistics, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ¹⁵Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL-IBSAL), Salamanca, Spain; ¹⁶Pathology Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; ¹⁷Radiotherapy Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

A mis padres

A mis abuelas

A la memoria de mi abuelo

Índice general

Glosario de abreviaturas	1
Introducción.....	5
1. Epidemiología y clínica del glioblastoma.....	7
2. Genética del glioblastoma	9
2.1. Alteraciones genéticas y moleculares del glioblastoma	9
2.2 Alteraciones en el perfil de expresión génica y subtipos genómicos de glioblastoma.....	17
2.3 Vías de señalización celular.....	22
2.3.1 Vía de Ras.....	25
2.3.2 Vía de PI3K/PTEN/AKT	27
2.3.3 Vía de RB/CDKN2A-p16 ^{INK4a}	27
2.3.4 Vía de TP53/MDM2/MDM4/CDKN2A-p14 ^{ARF}	29
2.4 Impacto de las alteraciones genéticas en el curso clínico del tumor.....	30
3. El microambiente inmune en el sistema nervioso central	32
3.1 Células inmunes residentes en el sistema nervioso central	33
3.2 Células inmunes derivadas de la sangre	38
3.3 Impacto clínico del estado del sistema inmune en el comportamiento del tumor	45
Hipótesis de trabajo y objetivos	49
Material, métodos y resultados	55

Artículo 1: “Estratificación pronóstica de adultos con glioblastoma multiforme primario según el perfil de amplificación génica del tumor.”	59
Artículo 2: “Los perfiles de expresión de los genes <i>EGFR</i> , <i>CDK4</i> , <i>MDM4</i> y <i>PDGFRA</i> son heterogéneos y no se asocian con la supervivencia de pacientes con GB primarios”	83
Artículo 3: “Los perfiles de células tumorales y células inmunes en el glioblastoma humano primario: impacto en la evolución clínica del paciente”	107
Discusión	135
Conclusiones	157
Referencias bibliográficas	161

Glosario de abreviaturas

A

ADN: Ácido desoxirribonucleico
 α -KG: α -cetoglutarato
AKT: Serina/treonina quinasa 1 o proteína quinasa B
Amp: Amplificación
ARN: Ácido ribonucleico
Arg1: Arginasa 1
ATRX: Gen remodelador de la cromatina ATRX

B

BHE: Barrera hematoencefálica

C

CCL: Ligando de quimiocinas de tipo CC
CCND2: Ciclina D2
CCR: Receptor de quimiocinas de tipo CC (del inglés, *C-C Motif Chemokine Receptor*)
CXCL: Ligando de quimiocina de tipo CXC (del inglés, *C-X-C Motif Chemokine Ligand*)
CDKN2A/CDKN2A-p16^{INK4a}/CDKN2A-p14^{ARF}: Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (del inglés, *cyclin dependent kinase inhibitor 2*)/Tránsito α del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A/ Tránsito β del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A
CDK: Ciclina dependiente de quinasa (del inglés, *cyclin dependent kinase*)
CMF: Citometría de flujo
CNA: Alteración en el número de copias (del inglés, *copy number alteration*)
CpG: Citosina-fosfoguanina
Cr: Cromosoma
CSCs: Célula madre tumoral (del inglés *cancer stem cells*)

D

DC: Célula dendrítica (del inglés, *dendritic cell*)
Del: Deleción

E

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *epidermal grow factor receptor*)

G

GAP: Perfil de amplificación génica (del inglés, *gene amplification profile*)
GAFL: Autofluorescencia verde (del inglés, *green autofluorescence*)

GB: Glioblastoma/s
GCS: Hormonas glucocorticoides/corticosteroides
GDP: Guanosina difosfato
GEO: Base de datos para perfiles de expresión génica ómnibus (del inglés, *gene expresión ómnibus*)
GEP: Perfil de expresión génica (del inglés, *gene expression profile*)
GTP: Guanosina trifosfato

H

2-HG: 2-hidroxiglutarato
HPF: Campos de alta potencia (del inglés, *high power fields*)

I

IDH/IDH1/IDH2: Isocitrato deshidrogenasa/ Isocitrato deshidrogenasa 1/ Isocitrato deshidrogenasa 2
iFISH: Hibridación *in situ* fluorescente sobre núcleos interfásicos
IFN γ : Interferon- γ
IHQ: Inmunohistoquímica
IL: Interleucina

K

KPS: Índice de Karnofsky

L

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

M

MDSC: Células supresoras derivadas de línea mieloide (del inglés, *myeloid-derived suppressor cells*)
MDM2: Protooncogén doble minuto murino (del inglés, *murine doble minute 2*)
MDM4: Regulador doble minuto murino 4 (del inglés, *murine doble minute 4*) de p53
MGMT: O-6-metilguanina-DNA-metiltransferasa
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, *major histocompatibility complex*)
MO: Médula ósea
MTAP: Metiltioadenosina fosforilasa (del inglés, *methylthioadenosine phosphorylase*)
mTOR: Diana de la rapamicina en mamíferos (del inglés, *mammalian target of rapamycin*)

N

NAD+: Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada
NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida
NADP+: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
NF1: Neurofibromatosis tipo 1
NK: Del inglés *natural killer*
NOS: No especificado (del inglés, *not otherwise specified*)
NOS2: Óxido nítrico sintasa 2 (del inglés, *nitric oxide synthase 2*)

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

P

p: Brazo corto de un cromosoma
PDGF-: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés *platelet-derived growth factor*)
PDGFR/ PDGFRA/ PDGFRB: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, *platelet-derived growth factor receptor*) / Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas / Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa alfa (del inglés, *phosphoinositol 3-kinase*)
PIK3CA: Subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa
PIK3R1: Subunidad reguladora 1 de la fosfatidilinositol 3-quinasa
PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensina (del inglés, *phosphatase and tensin homolog*)

Q

q: Brazo largo de un cromosoma

R

RB/RB1: Proteína de susceptibilidad al retinoblastoma (del inglés, *retinoblastoma susceptibility protein*)
R132H: Mutación en el codón 132 en el que cambia una arginina por una histidina

S

SNC: Sistema nervioso central
SNP/s: Polimorfismo/s de nucleótido único (del inglés, *single nucleotide polymorphism/s*)

T

TAM: Macrófagos asociados al tumor (del inglés, *tumor associated macrophages*)
TCA: Ácido tricarbóxico

TCGA: Abreviatura en inglés del proyecto *The Cancer Genome Atlas*

TERT: Transcriptasa inversa de la telomerasa

TGF β : Factor de crecimiento transformante- β (del inglés, *transforming growth factor beta 1*)

Th: Linfocitos T colaboradores (del inglés, *T helper*)

TIL: Linfocito infiltrante del tumor (del inglés, *Tumor infiltrating lymphocyte*)

TIMP-3: Inhibidor tisular de metaloproteinasas 3 (del inglés *tissue inhibitor of metalloproteinases 3*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , del inglés, *tumor necrosis factor-alpha*)

TP53: Supresor de tumores P53 (del inglés, *tumor protein P53*)

Treg: Célula T reguladora

V

v: Variante

VEGFA: Factor de crecimiento vasculo-endotelial A (del inglés, *vascular endothelial growth factor A*)

Introducción

1. Epidemiología y clínica del glioblastoma

El glioblastoma (GB) es una neoplasia maligna del sistema nervioso central (SNC) que resulta de la transformación neoplásica de células gliales, con el mayor grado de malignidad histológica (grado 4) según los criterios de la clasificación de tumores del SNC de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Aunque su etiología es desconocida, en la aparición del tumor se cree que están implicados factores ambientales y genéticos¹.
². En conjunto el GB constituye aproximadamente la mitad de todos los tumores cerebrales malignos primarios con una prevalencia en países desarrollados de 3 a 4 casos por cada 100.000 habitantes, siendo más frecuente en hombres que en mujeres. La incidencia aumenta en edades comprendidas entre los 75 y 84 años, siendo la edad media de aparición del tumor de 65 años^{3, 4}. Desde el punto de vista clínico, el GB se manifiesta con síntomas asociados a déficits neurológicos focales y edema asociado al aumento de la presión intracraneal y que dependen en gran medida de la localización y tamaño del tumor. Aunque los GB pueden localizarse en cualquiera de los lóbulos, el temporal es el que resulta afectado en un mayor número de pacientes². A pesar de su crecimiento rápido e infiltrativo, el GB no suele extenderse al espacio subaracnoideo ni diseminarse a través del líquido cefalorraquídeo⁵.

La mayoría de los GB son tumores primarios que surgen de “novo” como neoplasias agresivas y altamente invasivas, generalmente en ausencia de evidencia clínica, radiológica o histopatológica de lesiones tumorales precedentes de grado inferior. Aproximadamente dos tercios de los pacientes tienen antecedentes clínicos desde hace menos de 3 meses⁶, siendo su tumor primario, y de peor pronóstico que el denominado “GB secundario”. Este último deriva de la transformación o progresión de

astrocitomas de grado inferior, y tiende a ocurrir con una mayor frecuencia entre pacientes menores de 45 años, asociado a un curso clínico más favorable. La clasificación de la OMS del año 2016, engloba los GB dentro del grupo de astrocitomas difusos, distinguiendo, en función de la ausencia o presencia de mutaciones en el gen de la isocitrato deshidrogenasa 1 (*IDH1*), entre GB *IDH*-silvestres, mayoritariamente primarios, y GB *IDH*-mutados (predominantemente secundarios)⁵. Recientemente (agosto de 2021), esta clasificación vigente desde 2016 ha sido actualizada con la publicación de la nueva revisión⁷, que incluye los GB dentro de los gliomas difusos, como tumores de grado 4 que no presentan mutación de los genes *IDH*, eliminando así los términos de GB primario y secundario⁷ (Figura 1).

Clasificación de los tumores Astrocíticos		
OMS 2007	OMS 2016	OMS 2021
Grupo		
Tumores de tejido neuroepitelial	Gliomas difusos	Tumores glioneuronales y tumores neuronales (gliomas)
Criterio		
<i>Estirpe celular</i>	<i>Estirpe celular y genética (estado de IDH)</i>	
Subgrupos		
Astrocitoma pilocítico* (Grado I)	Astrocitoma <i>IDH</i> -mutado (Grado 2-3-4)	
Astrocitoma difuso (Grado II)		
Astrocitoma anaplásico (Grado III)		
Glioblastoma (Grado IV)		
	Astrocitoma difuso (Grado II)	Astrocitoma <i>IDH</i> -no mutado (Grado 2-3-4)
	Astrocitoma anaplásico (Grado III)	
	Glioblastoma (Grado IV)	
	Glioblastoma (Grado IV)	Glioblastoma <i>IDH</i> -no mutado (Grado 4)

Figura 1. Cambios en los criterios y la nomenclatura introducidos en las tres últimas versiones de la clasificación de tumores astrocíticos propuestas por la OMS desde 2007 para la clasificación de los GB. *Nota: en la clasificación de la OMS de 2016 el astrocitoma pilocítico se engloba dentro del grupo de otros tumores astrocíticos, mientras que en la clasificación de 2021 se engloba dentro de los gliomas

astrocíticos circunscritos. En el grupo de los gliomas difusos *IDH*-mutados en la revisión de 2016 se encuentra, clasificado como glioma difuso de grado IV, el glioma difuso de la línea media H3 K27M mutado, que en la clasificación de 2021 se considera dentro de los tumores pediátricos. NOS: en estos casos, el estado de la mutación *IDH* no se especifica (p. ej. al no haberse analizado).

Desde el punto de vista citológico, el GB es un tumor de composición heterogénea en el que se observan simultáneamente células pobremente diferenciadas, fusiformes, redondas y/o pleomórficas⁸. Para el diagnóstico de GB se requiere la presencia de 4 características histopatológicas: hiper celularidad, células gliales con atipia celular, proliferación microvascular y necrosis, distribuidas dentro del tumor de forma variable, habitualmente ocupando las áreas necróticas del centro del tumor, mientras que las células tumorales viables tienden a acumularse en la periferia del mismo⁵. La propiedad invasiva de las células, capaces de permanecer detrás de una barrera hematoencefálica (BHE) intacta, junto con la inestabilidad genómica del GB, y los cambios oncogénicos secundarios inducidos tras la progresión del tumor son factores responsables de la falta de eficacia del tratamiento, consistente en una resección quirúrgica seguida de radioterapia y/o quimioterapia asociada con agentes como temozolomida o nitrosoureas⁹, con escaso éxito tanto en el tratamiento estándar como en los múltiples ensayos clínicos realizados en las últimas décadas en pacientes con GB. En este contexto, el reciente desarrollo y evaluación de nuevos tratamientos dirigidos frente a dianas genéticas y/o inmunes, incluyendo las vacunas y otras estrategias de inmunoterapia anti-tumoral, podría abrir nuevas opciones terapéuticas prometedoras, que exigen un profundo conocimiento de las alteraciones genéticas y el microambiente inmune tumoral.

2. Genética del glioblastoma

2.1. Alteraciones genéticas y moleculares del glioblastoma

La transformación maligna de las células neuroepiteliales es un proceso continuo en el que de forma secuencial se adquieren alteraciones epigenéticas y genéticas múltiples con perfiles recurrentes en los GB (Tabla 1).

Tabla 1. Alteraciones genéticas, epigenéticas y genómicas detectadas en GB e involucradas en la aparición del tumor. (Modificado de Crespo *et al.*¹⁰).

Alteraciones genómicas	Incidencia	Referencias bibliográficas
Metilación de promotores génicos		
<i>MGMT</i>	45-51%	11-13
<i>TIMP-3</i>	28%	14, 15
<i>RB1</i>	6%	11
<i>CDKN2A-p14^{ARF}</i>	6%	16
<i>CDKN2A-p16^{INK4a}</i>	3%	16
Mutaciones genéticas		
<i>TERT</i>	84%	17
<i>EGFR</i>	26-55%	18-20
<i>TP53</i>	28%	18
<i>IDH1</i>	3%; 5%*	12, 21
<i>IDH2</i>	0%	21
Alteraciones en el nº de copias de ADN génico (CNA)		
Ganancias y amplificaciones génicas		
Ganancia del Cr 7	43-97%	12, 22, 23
Amp de <i>EGFR</i>	36-60%	20
Amp de <i>PDGFRA</i>	23%	24
Amp de <i>MDM2</i>	13%	25
Pérdida de heterocigosidad (LOH) y deleciones génicas		
LOH 10p	47%	26
LOH 10q	45-90%	12, 17, 26
LOH 10/ Del 10/Monosomía 10	41%	26
Del <i>PTEN</i>	25%	18
Del <i>CDKN2A-p16^{INK4a}</i>	31-78%	18, 20
LOH 1p	12%	27
LOH 9p	34%	12
LOH 13q	12%	27
LOH 19q	6%	27
LOH 22q	41%	14
Cambios en la expresión génica a nivel de RNA		
<i>EGFR</i>	60%	28
<i>PDGFRA</i>	13-44%	18, 29
<i>MDM2</i>	5-15%	30, 31

p: brazo corto del cromosoma; q: brazo largo del cromosoma; *De acuerdo con la nueva clasificación de 2021, este 5% ya no serían considerados dentro del grupo de los GB, sino dentro de los astrocitomas de grado 4 *IDH*-mutados; Amp: amplificación; Del: deleción; Cr: cromosoma.

La hipermetilación del ácido desoxirribonucleico (ADN)³², estaría involucrada en la oncogénesis de los gliomas a través de la inactivación de genes supresores de tumor mediada por la hipermetilación de sus promotores, facilitada a su vez por el gen o la proteína mutada. Como principal alteración epigenética, se ha identificado el silenciamiento que experimenta el gen O-6-Metilguanina-DNA-metiltransferasa (*MGMT*, en el cromosoma 10q26) por hipermetilación de su promotor. Esta modificación, conduce a la ausencia de expresión de ARNm y de la proteína codificada por el gen *MGMT*, al tiempo que potencia el efecto citotóxico de los fármacos que actúan como agentes alquilantes.

Además de la hipermetilación del gen *MGMT*, se ha descrito la existencia de hipermetilación de otros genes como el gen inhibidor tisular de metaloproteinasas 3 (*TIMP-3*, del inglés, *tissue inhibitor of metalloproteinases 3*), un gen relacionado con la inducción de apoptosis que se encuentra metilado en el 28% de los GB¹⁵, o el promotor del gen que codifica para la proteína de susceptibilidad al retinoblastoma, *RB1* (del inglés, *retinoblastoma susceptibility protein*), codificada a nivel del cromosoma 13q14, y que se encuentra metilado en el 6% de los casos¹¹. Así mismo, también se ha descrito la existencia de hipermetilación de los promotores de *p14^{ARF}* (tránsito β del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A) y de *p16^{INK4a}* (tránsito α del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A), en 6%, y 3% de los GB, siendo el porcentaje de metilación de estos genes superior en los previamente denominados "GB secundarios"¹⁶. Además de todas las anteriores, se ha descrito también alteración (por mutación) del promotor del gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa (*TERT*), codificado en el cromosoma 5, y que curiosamente se encuentra alterado también en la gran mayoría de los

oligodendrogliomas³³, de forma excluyente con las mutaciones en el gen remodelador de la cromatina ATRX (*ATRX*) codificado en el brazo largo del cromosoma X³⁴. Otras alteraciones relativamente comunes en los GB son la mutación o delección homocigótica del gen de la neurofibromatosis tipo 1 (*NF1*) (18%) codificado en el cromosoma 17³⁵, y las mutaciones en el gen supresor de tumores *TP53* que suelen afectar a los codones 248 y 273 y a los islotes CpG (citosina-fosfoguanina) localizados en el brazo corto del cromosoma 17 y que desde el punto de vista patogénico se han asociado con la progresión y la transformación maligna a astrocitomas de mayor grado con mutaciones de *IDH*³⁴. Sobre la base del proyecto TCGA (abreviado del inglés, *The Cancer Genome Atlas*) y de otros estudios moleculares, se han identificado también otras alteraciones genéticas menos comunes en GB entre las que se incluyen mutaciones en el gen *PIK3R1* (subunidad reguladora 1 de fosfatidilinositol 3-quinasa) codificado en el cromosoma 3 (10%)¹⁸, y en el gen que codifica la subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (*PIK3CA*) (5%).

Debido a que en 2016 la OMS incluyó las mutaciones en los genes *IDH1* (en el cromosoma 2q33) e *IDH2* (en el cromosoma 15q26) en su clasificación para la estratificación de los gliomas^{5, 7}, en los últimos años, se han referido los resultados de varios estudios en los que se ha analizado la presencia de dichas mutaciones en GB y, en especial, aquellas cuya mayor frecuencia afecta a codón 132 (R132H) del gen *IDH1* y a los codones R172 y R140 de *IDH2*²¹. *IDH1* codifica para una proteína que a nivel celular se localiza en el citoplasma y en los peroxisomas y que participa en el metabolismo de lípidos y glucosa³⁶, mientras que *IDH2* es una proteína que se encuentra en las mitocondrias donde interviene en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y en la protección

frente al estrés oxidativo³⁶. El producto de ambos genes *IDH* cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG) y reduce el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD^+) y el fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADP^+) a NADH y NADPH, respectivamente³⁷. Hasta la fecha, se han realizado numerosos estudios dirigidos a entender mejor el papel de las mutaciones de *IDH1* en la génesis de los gliomas. Inicialmente, se postuló que las mutaciones de *IDH1* podrían anular la función de la proteína, lo que llevaría a una síntesis reducida del metabolito α -KG³⁷; sin embargo, existen evidencias posteriores que demuestran que la proteína *IDH1* mutada también confiere un fenotipo de ganancia de función enzimática, asociado con la producción del metabolito alternativo 2-hidroxiglutarato (2-HG). Dado que 2-HG puede contribuir a la gliomagénesis³⁸, se ha planteado la posibilidad de que los tratamientos que reducen la producción de 2-HG podrían ser eficaces frente a los gliomas que presentaron mutación de *IDH1*. A su vez, en los gliomas, las mutaciones de *IDH1/2* se han asociado con un aumento del perfil de metilación, y en concreto con la hipermetilación del promotor del gen *MGMT* (>75%)^{39, 40}.

Además de las alteraciones anteriormente referidas, en el GB se han encontrado alteraciones en el número de copias de ADN (CNA, del inglés, *copy number alterations*) debidas a pérdida y ganancia de distintos cromosomas o regiones cromosómicas, siendo las más comúnmente encontradas las ganancias del cromosoma 7, a menudo acompañadas de otras alteraciones como la amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*, del inglés, *epidermal growth factor receptor*) (Figura 2), y la monosomía del cromosoma 10 o la delección del gen homólogo de fosfatasa y tensina (*PTEN*, del inglés, *phosphatase and tensin homolog*) codificado en este cromosoma^{22, 41},

⁴². En este sentido, la pérdida alélica o pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés, *loss of heterocigosity*) de la región cromosómica que contiene el gen *PTEN* en el cromosoma 10, se ha descrito en más del 70% de los GB^{17, 43}, siendo habitualmente 3 las regiones cromosómicas que resultan más frecuentemente afectadas: 10p14-15, 10q23-24 (la que contiene el gen *PTEN*) y 10q25-26. Por el contrario, las mutaciones del gen *PTEN* se encuentran generalmente en heterocigosis en una menor proporción de casos que oscilan entre el 25% y 44% de todos los GB⁵, ocasionando más de la mitad de ellas, la introducción de codones de parada prematuros que conducen a la traducción de proteínas truncadas. Las alteraciones que involucran al gen *PTEN* rara vez ocurren en los gliomas de bajo grado, mientras que la frecuencia de inactivación del gen *PTEN* aumenta en las etapas más avanzadas de la enfermedad asociadas con las pérdidas del cromosoma 10, lo cual constituye uno de los criterios empleados en la clasificación actual de la OMS para el diagnóstico del GB⁷. Las deleciones del gen *PTEN* se asocian con frecuencia con la amplificación de *EGFR*, planteando la posibilidad de que la interacción entre la señalización de *EGFR* y la anulación funcional de los genes supresores de tumores como *PTEN* y otros genes relevantes del cromosoma 10 pueda contribuir a la agresividad tisular del GB. En los GB se ha descrito también la pérdida del cromosoma 9¹² y deleciones de 9p que afectan al gen inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (*CDKN2A-p16^{INK4a}*)²⁰, siendo la deleción de este gen junto con la deleción de *CDKN2B* uno de los criterios empleados por la OMS como marcador de astrocitoma con *IDH*-mutado⁷. Así mismo, se han descrito deleciones que afectan a otros genes cercanos a los genes *CDKN2A-p16^{INK4a}* y *CDKN2B* en el cromosoma 9p como el gen de la metiltioadenosina fosforilasa (*MTAP*), cuya relevancia en GB sigue siendo

desconocida⁴⁴, y de 13q (que suelen incluir el gen *RB*), 19q²⁷ y 22q (incluyendo al gen supresor de tumores *TIMP-3* en 22q12.3)¹⁴.

La amplificación del gen *EGFR* o el incremento en el número de copias de ese gen, constituye una de las alteraciones moleculares más frecuentes entre los GB, estando presente en aproximadamente 40% de los casos, mientras que es una alteración poco habitual entre los astrocitomas con *IDH*-mutado de grado 4 (previamente denominados GB secundarios)^{18-20, 45}.

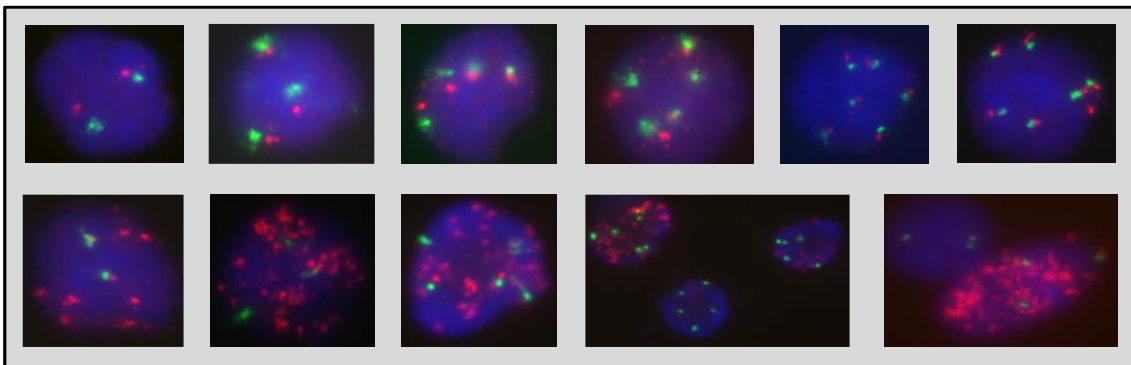


Figura 2. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células de GB cuyos núcleos teñidos en azul (con DAPI), e hibridados con la sonda dirigida frente al gen *EGFR* (señales rojas) y frente al centrómero del cromosoma 7 (señales verdes) muestran desde una célula normal (diploide con 2 copias del gen *EGFR* y 2 del centrómero del cromosoma 7) a varias células con un aumento del número de copias del cromosoma/gen *EGFR* (ganancia del cromosoma 7) detectándose 3, 4, 5, o 6 copias del cromosoma con amplificación del gen (muchas señales rojas por célula), ilustrando la gran heterogeneidad clonal a nivel celular de los GB.

Con frecuencia, la amplificación genética de *EGFR* se asocia tanto con la ganancia del cromosoma 7 (Figura 2) como con diferentes proteínas truncadas a nivel del dominio extracelular e intracelular, debido a la afectación de distintos exones⁴⁶, fenómeno que se ha relacionado desde hace tiempo con un mayor grado de malignidad del tumor⁴⁷. A su vez, la amplificación de *EGFR* a nivel genético (p.ej. de ADN), se ha relacionado con la sobreexpresión del producto del gen *EGFR* a nivel de ARNm⁴⁸. Otras alteraciones descritas de *EGFR*⁴⁵ incluyen la pérdida de 801 pares de bases, que involucra a los

exones 2-7 (de los 28 que constituyen el gen), generando una proteína truncada en su dominio extracelular, pero que es constitutivamente activa e independiente de ligando para su activación asociada a una mayor tasa proliferativa y supervivencia de las células mutadas⁴⁹ (Figura 3). En la mayoría de GB que presentan esta delección, denominada variante III (*EGFRvIII*)⁵⁰, ésta coexiste con la amplificación del gen *EGFR*, excepto en una pequeña proporción de tumores en los que la variante *EGFRvIII* se ha descrito en ausencia de amplificación de *EGFR*¹⁹.

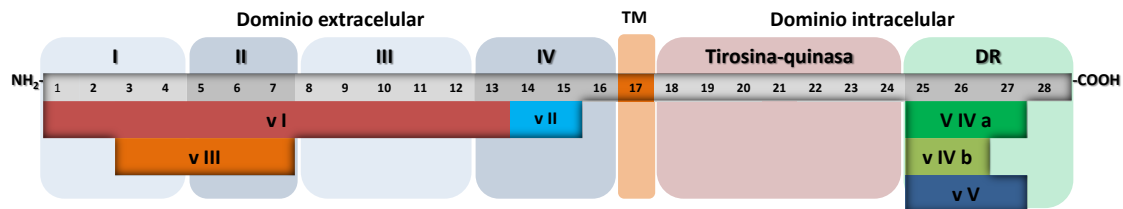


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de la proteína de EGFR con los dominios codificados por los 28 exones y las 5 variantes (v) descritas en GB (denominadas en números romano EGFR vI, vII, vIII, vIVa, vIVb y vV) en las que se encuentran delecionados distintos exones de *EGFR*. TM, dominio transmembrana.

Además de la variante *EGFRvIII*, se han descrito otras variantes genéticas de *EGFR* más infrecuentes en GB. Así, en *EGFRvI* se delecionan los exones 1 a 13; en *EGFRvII*, se ven afectados los exones 14 y 15 y las delecciones que ocurren en el extremo carboxilo terminal dan lugar a las variantes *EGFRvIV* (delección de los exones 25 a 27), o *EGFRvV* (a los exones 25 a 28). Finalmente, en algunos tumores se ha descrito también la coexistencia simultánea de varias de estas variantes y/o de delecciones de uno o varios exones, que de momento no se han incluido dentro de las variantes de *EGFR* descritas⁵¹⁻⁵³.

Desde el punto de vista funcional, el gen *EGFR* codifica una glicoproteína transmembrana que actúa como receptor tirosina quinasa (TKR) y que se autofosforila

al unirse a su ligando, induciendo la activación de vías de transducción de señal implicadas en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular⁵⁴.

Además de la amplificación de *EGFR*, en el GB se ha descrito con menor frecuencia la existencia de otras amplificaciones génicas, entre las que se incluyen la amplificación del gen del receptor alfa tirosina quinasa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGFRA*, del inglés, *platelet-derived growth factor receptor*), codificado en el cromosoma 4q, que se encuentra amplificado en 13% de los GB¹⁸ y la amplificación del protooncogén *MDM2*, localizado en el cromosoma 12q, que está presente en 5-15% de los GB. Este gen, *MDM2*, es un importante regulador negativo del gen supresor tumoral p53 (p53), y su amplificación constituye un mecanismo alternativo de escape del control de la proliferación celular regulado por p53^{18, 30}.

Todas las alteraciones genéticas características del GB antes referidas pueden y suelen tener consecuencias a nivel de la expresión de ARNm, provocando un aumento o disminución de la expresión de los genes afectados por las CNA, que terminan distorsionando los mecanismos reguladores de funciones celulares clave en la proliferación, diferenciación, supervivencia y/o apoptosis de las células tumorales. Por todo ello, aparte de conocer las alteraciones genéticas del ADN de los GB, es importante analizar también los perfiles de expresión génica más relevantes alterados en estos tumores, así como las vías de señalización afectadas, y su posible impacto en el curso clínico (p.ej. inicio, crecimiento) del tumor.

2.2 Alteraciones en el perfil de expresión génica y subtipos genómicos de glioblastoma.

La disponibilidad de nuevas tecnologías de alto rendimiento, como las técnicas de *microarrays*, permiten el análisis de los niveles de expresión de miles de genes e incluso de todo el genoma simultáneamente, proporcionando nuevos conocimientos sobre los patrones de genes sobreexpresados e infraexpresados en el tejido tumoral y que pudieran potencialmente estar implicados en la transformación maligna y la progresión del tumor. En este sentido, los primeros estudios del perfil de expresión génica (GEP, del inglés, *gene expression profile*) en los gliomas, permitieron ya identificar genes que se encontraban expresados de forma diferencial entre GB y oligodendrogliomas, entre astrocitomas de bajo y alto grado⁵⁵, entre GB primarios y secundarios⁵⁶, e incluso entre GB que presentan amplificación de *EGFR* y GB que no muestran amplificación de este gen⁵⁵, encontrando además perfiles de expresión génica distintos, entre gliomas con *IDH*-mutado y gliomas con *IDH*-silvestre⁴⁵. Estos resultados indican que histopatológicamente, los subtipos de gliomas, incluyendo los GB, muestran GEP característicos a nivel de ARNm susceptibles de ser utilizados para subclasificar estos tumores y/o predecir la evolución clínica de los pacientes⁵⁷. En este sentido, Nutt *et al.*⁵⁸ demostraron ya la potencial utilidad diagnóstica de los estudios de los GEP para la clasificación molecular de los gliomas al identificar dos conjuntos de genes que se asociaban, por un lado, con el GB clásico y, por otro, con los oligodendrogliomas anaplásicos, construyendo un modelo de predicción de clases que mostró una precisión global del 86%. Posteriormente, Phillips *et al.*⁵⁹, subdividieron los GB en tres grupos con distintos GEP, según la similitud observada entre los distintos GEP tumorales y los distintos tipos celulares generados durante la neurogénesis: GB proneurales (PN), proliferativos (PF) y mesenquimatosos (MQ) (Tabla 2). En conjunto, los genes del grupo PN estaban típicamente sobreexpresados en las formas menos agresivas de glioma de

alto grado, mientras que los subtipos PF y MQ eran más característicos de tumores agresivos y de alto grado, mostrando la clasificación propuesta una asociación significativa con la evolución clínica de los pacientes.

Tabla 2. Clasificaciones genéticas de GB entre los distintos subtipos de tumor.

Estudio	Clasificación		
Clasificación	Philips <i>et al.</i> ⁵⁹	Verhaak <i>et al.</i> ⁶⁰	Crespo <i>et al.</i> ²²
Nº de tumores	76	170	35
Subgrupos genéticos	Proneural	Proneural	Perfil III
	<i>EGFR</i> normal	<i>PDGFRA</i> amp	+7
	<i>PTEN</i> normal	<i>IDH1</i> mut del/mut (<i>TP53</i>) <i>PIK3CA/PIK3R1</i> mut	del(9p21)/+9q 10 normal
	Proliferativo y Mesenquimal	Clásico	Perfil I
	<i>EGFR</i> amp/normal +7 y -10 <i>PTEN</i> delecionado	<i>EGFR</i> amp del (10q) (<i>PTEN</i>) del (9p21) (<i>CDKN2A</i>)	<i>EGFR</i> amp -10 / del(10p) y del(10q) del(9p21)
		Mesenquimal	Perfil II
		del (17q11.2) (<i>NF1</i>)	+7 del(9p21) -10 / del(10p) y del(10q)
		Neural	Perfil IV
		Sin alteraciones específicas*	+7 9p21 normal -10
			Perfil V
		+7 +9 -10	

* Subgrupos definidos según la expresión de marcadores histológicos neuronales. amp: amplificación génica; mut: mutado; del: delecionado. Tabla modificada de Crespo *et al.*¹⁰.

Además de los dos estudios antes referidos, existen otros trabajos en los que se han identificado distintos subtipos moleculares de gliomas con relevancia pronóstica. Así, Freije *et al.*⁶¹, identificaron un perfil de expresión diferencial de 595 genes en 74 gliomas que se correlacionaba con la supervivencia global de pacientes con GB, mientras que Nutt *et al.*⁵⁸ identificaron que los GB caracterizados por sobreexpresión de genes involucrados en la neurogénesis mostraban un fenotipo más diferenciado asociado a mejor pronóstico, respecto a los GB con expresión de genes relacionados con la

proliferación celular y mayor invasión tisular que mostraban un fenotipo menos diferenciado asociado a menor supervivencia.

En un metanálisis realizado sobre un total de 267 GB⁶², se identificaron 377 genes con expresión diferencial y que permitía clasificar los GB en cuatro subtipos distintos, empleando análisis de agrupaciones de tipo jerárquico. Estos incluían los grupos PN/HC1A, PF/HC2A y MQ/HC2B además de un cuarto subtipo de GB con características híbridas entre los grupos HC2A y HC2B, denominado PF/MQ. Desde el punto de vista pronóstico, los pacientes con GB de tipo PN/HC1A mostraban una evolución más favorable en términos de supervivencia frente a los demás subtipos, si bien estos tumores con un perfil PN eran más frecuente entre pacientes más jóvenes, lo cual podría contribuir a explicar la mayor esperanza de vida y el mejor pronóstico de este subtipo de GB.

Vital *et al.*⁵⁵, investigaron la probable asociación existente entre el GEP, las alteraciones citogenéticas y la histopatología del tumor, encontrando GEP significativamente diferentes entre los gliomas de bajo y alto grado de malignidad, implicando dichos perfiles genómicos por un lado, genes involucrados en la regulación de la proliferación celular, apoptosis, reparación del ADN y transducción de señales y, por otro lado, CNA que afectaban a los niveles de ARNm de dichos genes⁴⁴. En conjunto, en este estudio Vital *et al.*⁵⁵ identificaron tres subgrupos de GB según su GEP y patrón citogenético, de las células tumorales, incluyendo: i) tumores con amplificación de *EGFR*, ii) GB con trisomía del cromosoma 7 aislada, y iii) tumores con cariotipos más complejos en ausencia de amplificación de *EGFR*. En este estudio se destaca la detección de amplicones (fragmentos de ADN amplificados) de forma recurrente en los cromosomas

7 (50%), 12 (22%), 1 (11%), 4 (9%), 11 (4%) y 17 (4%) y deleciones homocigóticas en las regiones cromosómicas 9p21 (52%) y 10q (22%), existiendo una elevada correlación directa entre la CNA de ADN y los niveles de ARNm detectados para la mayoría de los genes codificados en dichas regiones cromosómicas/cromosomas. En algunos amplicones, el impacto de las CNA del ADN en la expresión del ARNm correspondiente se restringía a un solo gen (*EGFR* en 7p11.2), mientras que, en otros, involucraba múltiples genes (11 genes en 12q14.1-q15 y 5 en 4q12, respectivamente)⁵⁵. En el caso de deleciones homocigotas a nivel de las regiones cromosómicas 9p21 y 10q23.31 que incluían múltiples genes, la asociación entre la CNA de ADN y la expresión de ARN se restringió a un único gen o a un número limitado de genes destacando la afectación del gen *MTAP* a nivel del cromosoma 9p21.

El análisis realizado por el consorcio del TCGA, basado en datos de expresión de ARNm y de CNA de ADN de más de 600 GB^{18, 45}, junto con datos de secuenciación de >600 genes en un subgrupo de 91 GB, revelaron la afectación de forma sistemática de tres vías de señalización celular —la vía de las TKR (88%), la vía de TP53 (87%) y la vía del RB (78%)— en las que estaban implicados el gen supresor de tumores *NF1* y el gen *PIK3R1*, referidos previamente como genes frecuentemente alterados en GB⁶³. En un estudio más reciente del consorcio, el TCGA estableció la existencia de cuatro subtipos de GB (PN, clásico, MQ y neural) en cuya definición se incluían, junto con los patrones de mutaciones somáticas (alteraciones de los genes *EGFR*, *NF1*, *PDGFRA* e *IDH1*), las CNA de ADN, y los GEP asociados al tumor⁶⁰. Estos cuatro subtipos de GB también diferían entre sí en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia global de los pacientes incluidos en los distintos estudios. En este sentido, los GB del grupo PN presentaron

activación de genes asociados al desarrollo de oligodendrocitos (*PDGFRA*, *OLIG2*, *TCF3* y *NKX2-2*) y PN (*SOX*, *DCX*, *DLL3*, *ASCL1* y *TCF4*) asociados a alteraciones de *TP53* y *PDGFRA*, y mutaciones de *PIK3CA/PIK3R1* e *IDH1*. A su vez, el grupo de GB clásico mostraba un perfil característico con elevada proliferación, frecuentemente asociada a amplificación de *EGFR*, monosomía del cromosoma 10 y delección homocigota de 9p21.3 con afectación del gen *CDKN2A-p16^{INK4a}*. Los GB del grupo MQ se definieron por la sobreexpresión de marcadores mesenquimales (*CHI3L1/YKL40* y *MET*) y astrocíticos (*CD44* y *MERTK*), junto a la delección o mutación de *NF1* (17q11.2). Finalmente, el GB neural, aunque carecía de un perfil genético distintivo y homogéneo, mostraba perfiles de expresión génica similares a los que se encuentran en tejido cerebral normal, con expresión de marcadores neuronales como *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* y *SLC12A5*.

Estudios más recientes han identificado nuevos biomarcadores con potencial pronóstico en el GB, incluyendo algunos miembros de la familia de genes *TIMPs*, como *TIMP-3* o *TIMP-4* entre otros⁶⁴. A su vez, Yin *et al.*, partiendo de los perfiles de expresión génica reflejados en el conjunto de datos de GB del TCGA y del “Gene Expression Omnibus (GEO)” han propuesto un sistema de puntuación pronóstica en base a los genes *PTPRN*, *RGS14*, *G6PC3*, *IGFBP2* y *TIMP4*, que identifica un grupo GB de alto riesgo y una supervivencia significativamente más corta, junto a un segundo grupo de tumores que incluía pacientes que presentaban mejor evolución clínica⁶⁵.

2.3 Vías de señalización celular

Como se ha mencionado previamente, muchos de los genes que están alterados en pacientes con GB incluyen genes involucrados en distintas vías de señalización

celular, cuya alteración facilita y/o promueve el crecimiento y progresión del tumor a nivel cerebral^{18, 66}. Así, hoy se sabe que existen varias vías de señalización celular que están involucradas en la génesis de los gliomas y en su transformación maligna, existiendo además interacciones complejas entre ellas, que contribuyen al inicio y transformación de los GB⁶⁷. En este sentido, actualmente se sabe que, tanto el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), son factores de crecimiento que actúan sobre receptores específicos con actividad tirosina quinasa (RTK), los cuales, juegan un papel importante en la gliogénesis normal y tumoral mediante la activación de complejas cascadas de señalización intracelular, moduladas por receptores acoplados a proteínas G y segundos mensajeros que convergen en múltiples vías con distintas funciones. La sobreexpresión de PDGF y del receptor de EGF (EGFR) en GB sugiere que estas vías de señalización de TKR son dianas críticas en la gliomagénesis⁶⁸.

La familia de PDGF consta de cuatro ligandos diferentes (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D), que señalizan a través del receptor de PDGF constituido por PDGFRA y PDGFRB y desempeñan un papel importante en el desarrollo de los tumores cerebrales al existir una actividad descontrolada de PDGFR en un subgrupo de gliomas con amplificación, reordenamiento genético, que afecta al locus del gen PDGFRA, y/o sobreexpresión de PDGF^{29, 69}. Desde el punto de vista funcional, estudios *in vivo* realizados en diferentes modelos animales han demostrado que PDGF-A estimula la proliferación de células madre neurales positivas para PDGFRA que residen en la zona subventricular del cerebro murino adulto, siendo capaz por sí solo de generar lesiones similares a gliomas⁷⁰, lo cual pone en evidencia la susceptibilidad de células madre

neurales adultas a la transformación oncogénica por alteración de PDGFRA. En este sentido, también se ha descrito que los genes que codifican los distintos ligandos PDGF muestran patrones de expresión específicos en distintas regiones tumorales dentro de un mismo GB, mostrando además una expresión diferencial según la localización del tumor en el cerebro⁶⁹.

A su vez, EGFR y sus ligandos se expresan de forma variable a lo largo del desarrollo cerebral desde las etapas embrionarias hasta la edad adulta⁷¹. Estos hallazgos sugieren que la señalización a través de EGFR tiene un papel fundamental en la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de distintos tipos de células del sistema nervioso central y sus precursores⁷¹. Hoy sabemos que en el GB la señalización de EGFR puede activarse de forma dependiente o independiente de ligando, a través de la sobreexpresión tanto de ligando como del receptor, y/o mediante la amplificación genómica de *EGFR* y/o la mutación del receptor, provocando la activación constitutiva del mismo en ausencia de ligando⁷². En cualquier caso, las propiedades oncogénicas de EGFR están asociadas con un aumento constitutivo e incontrolado de su actividad catalítica mediada por fosforilación. La introducción de EGFR mutado (truncado) mediante delección de los exones 2-7, genera la expresión de la denominada variante III del receptor (*EGFRvIII*) e incrementa drásticamente la proliferación y la supervivencia *in vivo* de células de glioma inyectadas en modelos animales⁴⁹.

En resumen, la activación constitutiva o inducida por ligando de PDGFR Y EGFR inicia una cascada de señalización de distintas vías de transducción de señales, con incremento de la proliferación celular, la migración, la capacidad de invasión y la resistencia a la apoptosis, junto a la neovascularización del tumor en pacientes con GB⁷³.

Entre otras vías de señalización, en esta cascada se activa la vía de Ras y otras vías que comentaremos a continuación.

2.3.1 Vía de Ras

Ras está constituido por una familia de proteínas G fijadoras de nucleótidos de guanosina, que se encuentran activas cuando están unidas a guanosina trifosfato (GTP) e inactivas una vez se unen a guanosina difosfato (GDP)⁷⁴. Su activación, ya sea mediada por receptores o por mutaciones oncogénicas, es muy frecuente en distintos tumores humanos y contribuye al desarrollo, crecimiento y supervivencia celulares, observándose un aumento de la actividad de la vía Ras en prácticamente todos los GB⁷⁵. Tras la activación de receptores con actividad tirosina quinasa como EGFR o PDGFR, las proteínas SOS 1/2 activan Ras con GTP lo cual promueve que Ras-GTP active a Raf y esta proteína active a MEK, provocando la fosforilación y consiguiente activación de las proteínas ERK y MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) (Figura 4).

Además, Ras-GTP también activa la proteína fosfoinositol 3-quinasa alfa (PI3K, del inglés, *phosphoinositol 3-kinase*) y la proteína Ral-guanina a través de sus proteínas/moléculas efectoras descendentes, incluidos los factores de intercambio de nucleótidos. Como consecuencia de esta cascada de señalización, se promueve la progresión en el ciclo celular, la supervivencia y la migración celular⁷⁴. Ras-GTP se encuentra en una encrucijada importante en esta vía de transducción de señales traduciendo los mensajes extrínsecos, no sólo de esta vía, sino de varias otras vías de señalización, como las vías de PI3K/AKT o de PI3K/Rac/Rho, que también influyen en la proliferación, supervivencia y migración celular. Dentro de la vía de Ras, en los GB

también se ha constatado un aumento de la actividad de señalización mediada por la quinasa regulada por MAPK⁷³, aunque de momento sigue sin conocerse en detalle su posible papel e implicaciones en la génesis de los gliomas. Así mismo, la vía de señalización de Ras también puede activarse a través de la pérdida de función del gen *NF1*, un regulador negativo de Ras que, según los resultados del consorcio TCGA, se encuentra mutado con pérdida de función del gen en aproximadamente 20% de los GB¹⁸.

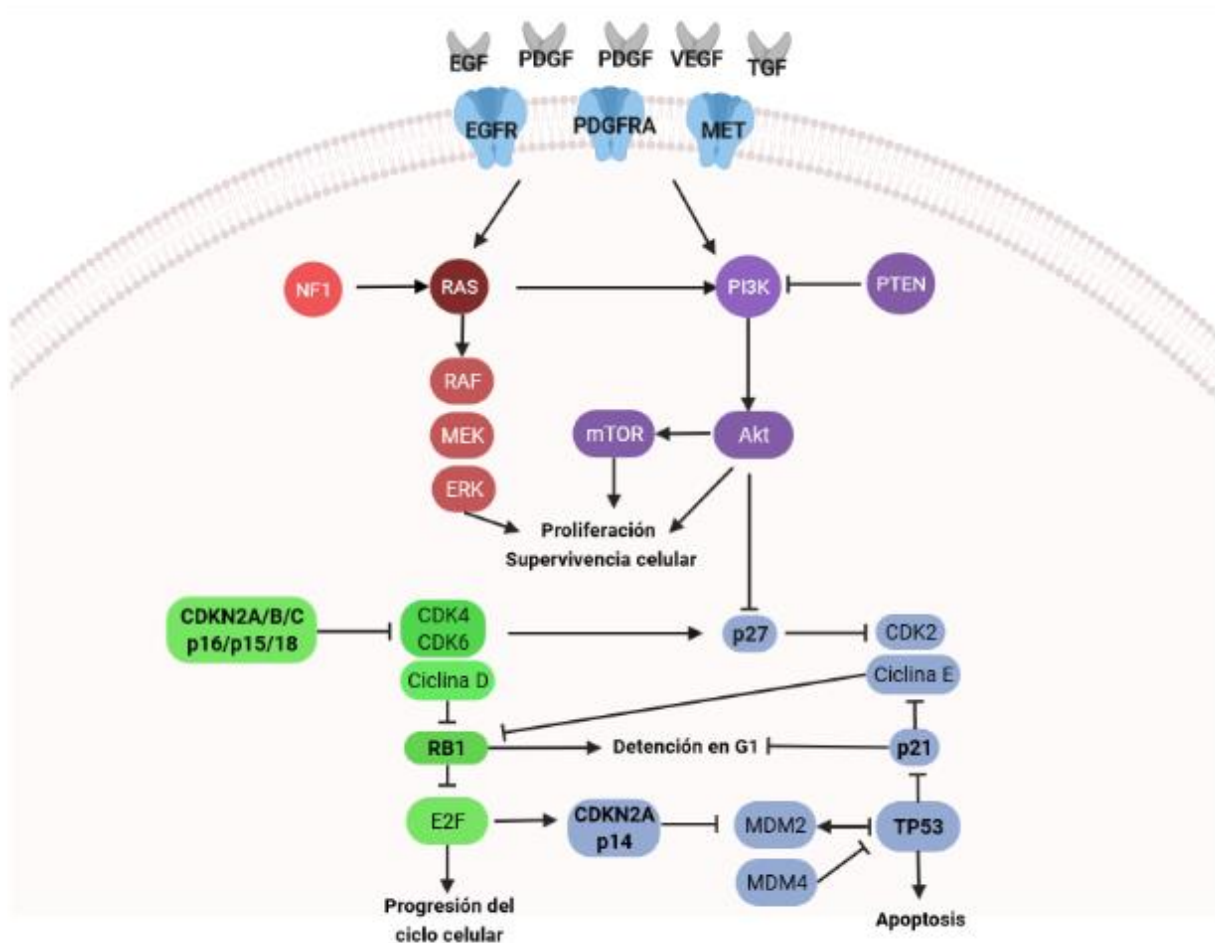


Figura 4. Representación esquemática de las diferentes anomalías genéticas y las principales vías de señalización implicadas en la patogénesis del GB. En la vía de señalización de Ras y PI3K/PTEN/AKT, los receptores tirosina quinasa se activan y reclutan a PI3K, convirtiendo el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato en PIP3. A continuación, se activan moléculas efectoras como AKT y mTOR, que ayudan a inducir la proliferación celular y bloquear la apoptosis tanto por esta vía, como a través de la vía de RB y la vía de TP53 (al inhibir a p27), lo que resulta en un incremento de E2F que, al ser inhibido por RB1 a través de CDK2 y la ciclina E, lleva a la progresión en el ciclo celular y, a su vez, al incremento de MDM2, un inhibidor

de TP53, lo cual provocaría el bloqueo de la apoptosis. La mutación de TP53 o el aumento de la degradación de TP53 debido a la actividad del protooncogén MDM2, altera el ciclo celular normal y la apoptosis. En la vía de RB, su fosforilación y activación por parte de los complejos formados por CDK4 y CDK6 con miembros de la familia de la ciclina D, provocan también la liberación de E2F, induciendo la proliferación celular mediante la transcripción de genes que promueven la síntesis de ADN. Figura modificada de Crespo *et al.*¹⁰.

2.3.2 Vía de PI3K/PTEN/AKT

La señalización a través de la vía mediada por las 3 proteínas moduladoras PI3K, PTEN y la proteína quinasa AKT, también se ha visto implicada en la patogénesis del GB⁷⁶. Así, hoy se sabe que el reclutamiento de PI3K en la membrana celular activa moléculas efectoras en el inicio de la ruta de señalización, como AKT y mTOR. Ambas proteínas son clave en la inducción del crecimiento tumoral a través del aumento de la proliferación y supervivencia celular al bloquear la muerte por apoptosis⁷⁷. La proteína codificada por el gen supresor de tumor *PTEN* regula negativamente PI3K, y pierde con frecuencia su función en los GB debido a la LOH en el *locus* 10q23.3 o a mutaciones genéticas (15% a 40%) asociadas a pérdidas de función. Ambas alteraciones de PTEN causan la activación constitutiva de la vía de PI3K, asociada a niveles elevados de AKT⁷⁶. Con ello se anula el papel importante que tiene PTEN en la inducción de apoptosis y la detención del ciclo celular en la fase G1, junto con su papel en la regulación de la diferenciación celular⁷⁸.

2.3.3 Vía de RB/CDKN2A-p16^{INK4a}

La vía de señalización de RB/ CDKN2A-p16^{INK4a} juega un papel central en la regulación del ciclo celular y la proliferación celular, dado que sus componentes son activados y/o inhibidos por señales promotoras e inhibitoras del crecimiento⁷⁹. El gen *RB* (13q14) codifica la fosfoproteína RB de susceptibilidad al retinoblastoma, que en

células inactivas se encuentra en un estado hipofosforilado (activo) unida a E2F; esto evita la transcripción de genes importantes para la mitosis y, por lo tanto, previene la progresión a través del punto de control del ciclo celular a nivel de la transición G1/S. En células activadas mediante señalización a través de receptores como los factores de crecimiento como EGFR y PDGFR, se induce la expresión de ciclina D1 y la activación del complejo CDK2/ciclina E tras la degradación de su inhibidor, p27Kip1. Estos complejos CDK-ciclina activados desencadenan la fosforilación de RB en las etapas más avanzadas de la fase G1 del ciclo celular, fosforilación que se mantiene a partir de ahí a lo largo de las fases S, G2 y M. La proteína RB fosforilada (inactiva) permite la liberación de E2F, lo que conlleva la activación transcripcional de genes promotores del ciclo celular, necesarios para la síntesis de ADN y la proliferación celular⁷⁷ (Figura 4). Los reguladores negativos de la vía de señalización de RB incluyen la familia de proteínas Ink4 (CDKN2A-p16^{INK4a}, CDKN2B-p15^{INK4b}, CDKN2C-p18^{INK4c} y CDKN2D-p19^{INK4d}), que compiten con las ciclinas-D por las quinasas dependientes de ciclina (CDK, del inglés, *cyclin dependent kinase*) 4 y/o CDK6, para prevenir la formación del complejo quinasa activo que fosforila RB⁷⁹. La inactivación de la vía RB puede ocasionarse a través de una interacción interrumpida RB-E2F por mutación del propio gen RB, por pérdida de expresión de RB, o por inactivación de RB por fosforilación mediada por los complejos CDK/ciclina. A su vez, las CDK pueden activarse mediante un aumento en la cantidad de enzima catalítica, de la cantidad de sus cofactores (ciclinas) y/o por una disminución en la cantidad de inhibidores de CDK endógenos (p. ej. CDKN2A-p16^{INK4A}). Además, el gen *CDKN2A* codifica para dos proteínas supresoras de tumores distintas (p16^{INK4a} y p14^{ARF}) que actúan en diferentes puntos de control del ciclo celular. Por un lado, p16^{INK4a} actúa a través de la vía de RB, mientras que p14^{ARF} ejerce su acción a través de la vía de TP53⁸⁰.

Debido a que CDKN2A-p16^{INK4a} regula negativamente CDK4 y p14^{ARF} inhibe MDM2, provocando que TP53 no se desintegre, la activación de ambos genes por delección homocigótica desregula las vías RB y TP53⁸¹. Esta vía de RB está alterada en el 78% de los GB primarios⁷³, detectándose delección y mutación homocigótica de CDKN2A-p16^{INK4a} y RB en el 52% y el 11% de estos tumores, respectivamente, y la delección homocigótica de CDKN2B-p15^{INK4b} y CDKN2C-p18^{INK4c} en el 47% y el 2% de los casos, respectivamente. A su vez, la amplificación de los genes CDK4, CDK6 y CCND2 (ciclina D2) estaría presente en el 18%, 1% y 2% de los GB, respectivamente¹⁸. AKT también podría inhibir la expresión de p21 a través de su fosforilación y la activación de MDM2. Además, la proteína AKT activada ejerce una actividad anti-apoptótica al fosforilar e inactivar proteínas de señalización pro-apoptóticas como BAD y la caspasa 9, mecanismo mediante el cual podría contribuir a un mayor potencial invasivo y metastásico tumoral al estimular la secreción de metaloproteinasas de la matriz extracelular⁸².

2.3.4 Vía de TP53/MDM2/MDM4/CDKN2A-p14^{ARF}

La vía de TP53/MDM2/MDM4/CDKN2A-p14^{ARF} se activa en respuesta a condiciones de estrés celular y facilita la reparación del ADN o induce muerte celular en caso de daño grave, evitando que las células con ADN mutado o dañado se dividan. TP53 regula transcripcionalmente los promotores de genes efectores, como p21, capaces de bloquear la progresión en la fase G1 del ciclo celular al unirse e inhibir la función de las proteínas ciclina-D⁸³. Esto permite que el ADN sea reparado antes de la mitosis y, por lo tanto, vincula directamente la acción de p21 a la función supresora de tumor de TP53. Además, las vías TP53 y RB interactúan entre sí a través de p21. En este sentido, hallazgos recientes demuestran que TP53 también regula la proliferación, diferenciación

y supervivencia de las células madre, lo cual subraya aún más la posible relevancia de TP53 en la supresión de la génesis y desarrollo de los GB⁸⁴. Tras el estrés, la actividad de TP53 se ve bloqueada por su regulador negativo MDM2, cuya transcripción es inducida mediante un circuito de retroalimentación negativa por la propia proteína TP53⁸¹, además de por la proteína reguladora MDM4. La mutación y/o amplificación de TP53 presente en los GB interrumpiría la vía de señalización de TP53, la sobreexpresión de MDM2 y/o pérdida de expresión de CDKN2A-p14^{ARF}, lo cual conduciría a un incremento descontrolado de la proliferación celular y la formación de tumores (Figura 4). Según el consorcio TCGA, la vía de TP53/MDM2/MDM4/CDKN2A-p14^{ARF} en su conjunto estaría alterada en el 87% de los GB; en el 35% de los casos debido a la mutación o delección homocigótica de *TP53*, en el 14% por la amplificación de *MDM2*, en el 7% de los tumores por la amplificación de *MDM4*; y debido a la delección o mutación homocigótica de *CDKN2A-p14^{ARF}*, en el 49% de todos los GB, respectivamente¹⁸.

2.4 Impacto de las alteraciones genéticas en el curso clínico del tumor

En la última década, se ha intentado definir la importancia clínica de las distintas alteraciones genéticas presentes en los GB, con el fin de lograr una clasificación más precisa de este grupo de tumores con impacto pronóstico, al permitir predecir mejor la evolución clínica del tumor y/o su respuesta al tratamiento. En este contexto, han cobrado especial relevancia, desde el punto de vista clínico, la amplificación del gen *EGFR*, las mutaciones *IDH1/IDH2* y la hipermetilación del promotor del gen *MGMT*, además de la detección de la delección simultánea de los cromosomas 1p y 19q, característica de gliomas de bajo grado, al incluirse todas ellas como nuevos criterios para el diagnóstico y clasificación de los tumores del SNC según la OMS⁷. En

contraposición, el análisis de los GEP sigue sin utilizarse de forma generalizada en la rutina clínica para la subclasificación de los GB. Por otra parte, existen resultados controvertidos sobre el impacto y relevancia pronóstica de algunas alteraciones génicas, como la amplificación de *EGFR* en GB, constituyendo éste, uno de los genes cuyo estudio se mantiene en la nueva clasificación. Así, mientras algunos estudios reportan que la amplificación de *EGFR* se asocia con un mal pronóstico y una supervivencia más corta de los pacientes con GB⁸⁵, otros afirman que la amplificación de *EGFR* no mantendría una asociación significativa con la supervivencia e incluso podría estar asociada a un mejor curso clínico⁸⁶. Estos resultados contradictorios podrían deberse a la coexistencia de distintos perfiles genéticos/genómicos en pacientes que presentan amplificación del gen *EGFR*, a las alteraciones del cromosoma 7 subyacentes, y/o a la coexistencia de alteraciones en otras regiones cromosómicas.

Por lo que respecta a la variante genética más común de *EGFR*, *EGFRvIII*, también se han referido resultados contradictorios. Así, mientras que para algunos autores la variante *EGFRvIII* impulsa un mecanismo paracrino que promueve la proliferación tumoral de células de glioma humano que expresan EGFR y de células madre, aumentando por lo tanto la heterogeneidad y capacidad invasiva del tumor⁸⁷, para otros, esta variante genética no se asociaría con un pronóstico desfavorable⁸⁸, siendo incluso un marcador molecular asociado a una supervivencia global más prolongada entre los pacientes con GB que han recibido tratamiento convencional⁸⁹. En paralelo se ha investigado si las alteraciones de *EGFR* podrían contribuir a predecir la respuesta a terapias dirigidas frente a este receptor. En este sentido, desde hace algunos años se han desarrollado y ensayado varias terapias dirigidas frente a *EGFR*, con anticuerpos

frente a EGFR y pequeñas moléculas inhibidoras de EGFR como el gefitinib y erlotinib⁹⁰, además de tratamientos basados en el silenciamiento del ARNm, conjugados del ligando del receptor con toxinas y los radioinmunoconjugados⁵⁴. Aunque la terapia génica combinada centrada en EGFR y otras dianas descendentes en sus vías de señalización podrían constituir un enfoque prometedor para alcanzar un efecto inhibitorio deseado sobre la capacidad invasiva y la angiogénesis tumoral⁹¹, los resultados clínicos de estos estudios siguen siendo muy preliminares.

Respecto a las mutaciones de *IDH1* es preciso destacar que están presentes, junto a mutaciones en *TP53*, con mayor frecuencia en los pacientes más jóvenes, siendo estas alteraciones características de los antes denominados GB secundarios o con *IDH*-mutado, y hoy incluidos entre los astrocitomas grado 4 de la clasificación de la OMS de 2021⁷. Desde la clasificación de la OMS de gliomas y otros tumores del SNC de 2016 y, por lo tanto, también en la nueva clasificación de la OMS de 2021, la presencia de mutaciones en los genes *IDH1/2* supone en general una mejor evolución clínica, lo que hace necesaria su detección ya desde el momento del diagnóstico para poder discriminar entre GB y otros subtipos de gliomas que presentan dicha mutación^{5,7}.

Finalmente, las variantes genéticas del gen *TERT* se han asociado también con un mayor riesgo de desarrollar GB, condicionando las mutaciones somáticas del promotor de *TERT* una reducción de la supervivencia global de los pacientes diagnosticados en GB⁹².

3. El microambiente inmune en el sistema nervioso central

El SNC cuenta con unas condiciones microambientales únicas debidas en parte a la permeabilidad selectiva de la BHE, que limita la difusión libre de células inmunes y

moléculas desde la circulación sanguínea al tejido cerebral y, por tanto, la exposición del parénquima cerebral a los antígenos y metabolitos circulantes, generando unas condiciones ambientales en el SNC que difieren significativamente de las de la mayoría de órganos y tejidos^{93, 94}. Todo ello convierte el cerebro en un órgano inmunoprivilegiado, en el que habitualmente la capacidad de llevar a cabo una respuesta inmune se encuentra disminuida e incluso ausente⁹⁵. Sin embargo, en la actualidad se cuestiona, al menos en parte, este paradigma, existiendo evidencias cada vez más claras que demuestran que el SNC interactúa dinámicamente con el sistema inmunológico sistémico⁹⁶, sin menoscabo de una liberación limitada al SNC de fármacos sistémicos (tanto anti-tumorales como para otras enfermedades del SNC), y que solo son capaces de cruzar la BHE en dosis adecuadas cuando se administran localmente o en dosis elevadas, ya sean péptidos de vacunas, algunos anticuerpos monoclonales humanizados y agentes quimioterápicos.

3.1 Células inmunes residentes en el sistema nervioso central

En condiciones normales, en el SNC, se hallan células del sistema inmune, como las células de la microglía, los macrófagos tisulares diferenciados residentes en el cerebro desde el desarrollo embrionario y un número muy limitado de linfocitos T⁹⁷. De todos estos tipos celulares, las células de la microglía constituyen el componente mayoritario y, por lo tanto, las células inmunes primarias del SNC, con capacidad de generar una respuesta inmune innata⁹⁸. El espectro de propiedades y actividades funcionales de estas células del SNC son tan amplias como las de los macrófagos convencionales, e incluyen las funciones depuradoras de migración tisular, fagocitosis, y presentación de antígenos a células T CD4⁺ y células T CD8⁺ a través de moléculas del

complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) de clase II y HLA de clase I, respectivamente⁹⁸. Fenotípicamente, las células de la microglía (parenquimatosa) se diferencian de otros macrófagos que infiltran el tejido cerebral de acuerdo a los niveles de expresión del antígeno leucocitario común CD45, al presentar los primeros niveles inferiores de expresión de este marcador respecto a los observados en los macrófagos⁹⁵, siendo ambos tipos celulares positivos para CD11b⁹⁹. Aunque con relativa frecuencia se ha empleado indistintamente el término macrófago o microglía, a la hora de referirse a poblaciones de células mixtas de macrófagos residentes en el tejido cerebral (microglía) y macrófagos infiltrantes derivados de médula ósea (MO), ambos constituirían poblaciones celulares distintas. A su vez, en ambas se han identificado distintos subtipos funcionales, incluyendo los macrófagos proinflamatorios (de tipo M1) activados por la “vía clásica” de la respuesta inmune innata, capaces de promover una respuesta antitumoral, y los macrófagos inmunorreguladores (de tipo M2), activados por mecanismos alternativos y con efectos pro-tumorales (Figura 5).

Los macrófagos de tipo M1 participan como células inductoras y efectoras en la activación e inducción de la respuesta inmune adaptativa por parte de linfocitos T colaboradores (Th, del inglés, *T helper*) de tipo 1 (Th1), produciendo citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , del inglés, *tumor necrosis factor-alpha*) y la IL-6¹⁰⁰. A su vez, estas células regulan positivamente la expresión de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2, del inglés, *nitric oxide synthase 2*) y producen formas reactivas de oxígeno y nitrógeno¹⁰¹. Además, estos macrófagos de tipo M1 tienen capacidad de presentación de antígenos y median

respuestas inmunitarias innatas contra parásitos intracelulares y células tumorales¹⁰²⁻¹⁰⁴.

A diferencia de los macrófagos M1, los macrófagos de tipo M2 se activan mediante la exposición a IL-4, IL-13 y glucocorticoides/corticosteroides¹⁰⁵; comparten un fenotipo funcional con baja expresión de IL-12, IL-23 y niveles elevados de IL-10, junto con una producción variable de citocinas antiinflamatorias, dependiendo de las señales que hayan podido inducir su activación¹⁰⁴.

Además, los macrófagos de tipo M2 mantienen una elevada expresión de receptores carroñeros, de receptores de manosa y galactosa (por ejemplo, CD163, CD206)¹⁰⁶, y son positivos para arginasa 1 (Arg1), lo cual les permite un cambio del metabolismo de la arginina hacia la producción de ornitina y poliaminas¹⁰⁷. En general, las células de tipo M2 participan en respuestas inmunitarias en las que se activan por acción de los linfocitos de tipo Th2 y están presentes en tumores establecidos donde ejercen funciones inmunorreguladoras^{102, 104, 108} que promueven la progresión tumoral, además de la reparación y remodelación tisular¹⁰⁹, y la angiogénesis al producir factor de crecimiento vascular-endotelial de tipo A (VEGF-A)¹¹⁰; carecen típicamente de actividad citotóxica al bloquear la infiltración y proliferación de células T CD8⁺.

La polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 o M2 depende de las citocinas presentes en el medio y del microambiente local, en el cual, los productos secretados por los propios macrófagos polarizados también pueden actuar sobre las células normales circundantes del SNC, como ocurre con la IL-1 β , capaz de inducir la producción de citocinas y factores de crecimiento adicionales, que refuerzan los efectos inflamatorios asociados al tumor, generados a nivel cerebral¹¹¹.

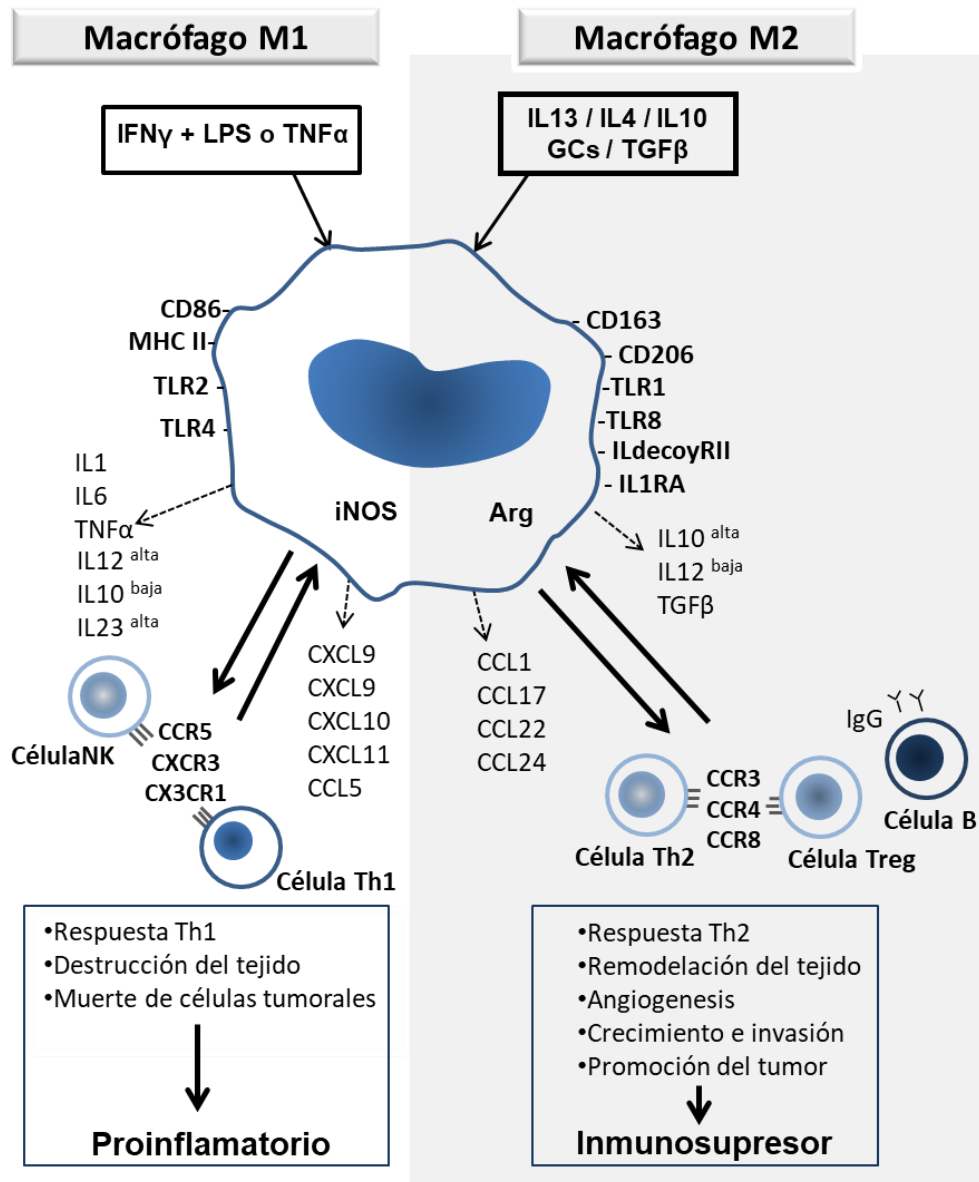


Figura 5. Principales subtipos funcionales de macrófagos identificados en tejidos tumorales y sus interacciones con las células linfoides que infiltran el tumor. Los macrófagos asociados al tumor pueden ejercer efectos antitumorales o pro-tumorales, dependiendo de su polarización funcional. En la figura se muestran las interacciones más relevantes y las propiedades funcionales de las dos poblaciones principales de macrófagos tisulares descritas hasta la fecha (macrófagos M1 y M2), así como las diferentes citocinas y quimiocinas relacionadas con ellos. Figura adaptada de Domingues *et al.*¹¹². (Imagen seleccionada para la portada del volumen 53 de la revista *Brain Behavior and Immunity*).

A pesar de todo lo anterior y de la posible utilidad de la clasificación funcional de los macrófagos en células de tipo M1 y M2, cabe señalar que el equilibrio entre las células M1/M2 representa una simplificación excesiva de los perfiles funcionales de los

macrófagos a nivel tisular, sin que llegue a reflejar completamente su complejidad. En este sentido, hoy se sabe que el microambiente tumoral en los GB está integrado por una red compleja de distintos tipos de células y componentes de la matriz extracelular, en la que las células neoplásicas interactúan con los fibroblastos, las células del endotelio vascular y una gran variedad de tipos de células inmunes que infiltran el tejido tumoral y peri-tumoral entre otros componentes. Todo ello, unido a la aparición de alteraciones genéticas en el tejido glial termina generando un medio apropiado para el desarrollo y crecimiento del tumor, con características y un entorno altamente inmunosupresor. Aunque el desarrollo y el crecimiento tumoral dependen en gran medida de la coexistencia de un microambiente adecuado, las células tumorales *per se* también inducen cambios significativos en el tejido donde viven y crecen¹¹³. De manera similar, las células inmunes presentes en el microambiente tumoral pueden modular sus funciones anti-tumorales o pro-tumorales, pudiendo así desempeñar funciones duales con potencial para suprimir o promover el crecimiento y transformación maligna del tumor¹⁰², habitualmente con un predominio de su función pro-tumoral, a medida que las células tumorales adquieren mecanismos de "evasión inmunitaria". En estas circunstancias, el tumor no solo logra escapar del sistema inmunológico del huésped, sino que puede desarrollar además un fenotipo capaz de manipular las células inmunes circundantes (por ejemplo, a través de la secreción de quimiocinas y citocinas) y modificar su función para crear un microambiente que favorecería la progresión tumoral y la resistencia al tratamiento a nivel local^{108, 114}. Hasta la fecha, se han identificado muchos mecanismos de evasión inmunitaria por parte de las células tumorales, incluida la inhibición de las funciones de las células inmunes o la apoptosis de las células efectoras antitumorales, junto con la producción tanto de factores de crecimiento como

de factores angiogénicos que estimulan la reparación y vascularización de los tejidos y, en consecuencia, también el crecimiento tumoral¹¹³.

3.2 Células inmunes derivadas de la sangre

Mediante distintas técnicas, se ha detectado que la presencia de distintos subtipos de células inmunes que infiltran el tejido tumoral de pacientes con GB y otros tipos de gliomas, típicamente incluyen tanto células de línea mieloide como linfoide (Tabla 3).

Tabla 3. Marcadores utilizados en estudios previos para la detección de distintas poblaciones de células inmunes.

Células inmunes	Marcadores	Referencias
Células mieloides		
TAM/microglía	CD11b/CD68/CD14/HLA-II	99, 115–121
M1	CD11c/MHC-II/CD86/iNOS/CD192	122, 123
M2	CD163/CD204/CD206	120, 122, 124
MDSC	CD33/CD11b	125, 126
Monocíticas	CD33/CD11b/CD14	126, 127
Granulocítica	CD33/CD11b/CD15	126, 127
Neutrófilos	CD11b/CD66b/CD63/anti-MPO	126, 128
DC	CD1c/CD11c/CD83/CD123/HLA-II	126, 129
Mieloides	CD1c/CD11c	115
Plasmocitoides	BCDA-2	115
Células linfoides		
Células T (CD3 ⁺)	CD3	130, 131
Células TCD8 ⁺	CD3/CD8	132, 133
Células TCD4 ⁺	CD3/CD4	115, 130
Células Tregs	CD3/CD4/CD25/FoxP3/CTLA-4/CD45RA	126, 134
Células B	HLA-II/CD19/CD20	115, 126, 132
Células NK	CD56/CD16	119, 132

TAM: macrófagos asociados al tumor (del inglés, *tumor associated macrophages*)

Entre las poblaciones de células mieloides infiltrantes descritas hasta la fecha, se incluyen los macrófagos asociados al tumor (TAM, del inglés, *tumor associated macrophages*) procedentes de la sangre, además de células mieloides supresoras (MDSC, del inglés, *myeloid-derived suppressor cells*), células dendríticas (DC, del inglés

dendritic cells) y granulocitos neutrófilos. Es preciso destacar que todas estas poblaciones de células mieloides se superponen parcialmente en su fenotipo con las propias células mieloides nativas del SNC, lo que puede dificultar la determinación de si corresponden a células residentes en el tejido o si se trata de células reclutadas desde el torrente sanguíneo que llegan al cerebro atraídas por el propio tumor y correspondiente micromedioambiente.

En este sentido, varios autores han referido de forma recurrente la existencia de infiltración por macrófagos en distintos tipos de tumores cerebrales incluyendo los meningiomas¹³⁵ y los gliomas^{99, 115}, proponiendo, además, fenotipos capaces de discriminar entre las células de la microglía residentes en el SNC y los macrófagos infiltrantes provenientes de la sangre, basados en combinaciones de marcadores, como los proporcionados por el perfil de expresión de CD45⁺/CD11b⁺⁹⁹ (Tabla 4).

Además de estos dos tipos de células mieloides, en los GB se ha referido la presencia de MDSC que muestran características fenotípicas parcialmente compartidas con los macrófagos, además de una importante plasticidad fenotípica y funcional dependiendo del microambiente circundante¹³⁶, y cuya actividad inmunosupresora constituye uno de los mecanismos de evasión inmunitaria más prevalentes en pacientes con cáncer. Las MDSC constituyen un grupo heterogéneo de células mieloides inmaduras cuya caracterización sigue siendo fundamentalmente descriptiva, debido a la falta de marcadores específicos en humanos¹¹⁴. Suelen identificarse por poseer un inmunofenotipo CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA-DR⁻CD33⁺¹³⁷. Desde el punto de vista histológico, las MDSC se movilizarían durante la tumorigénesis infiltrando tumores en desarrollo, donde promueven la neovascularización del tumor y alteran los principales

mecanismos de inmunovigilancia, incluida la presentación de antígenos por parte de las DC, la activación de células T, la polarización de macrófagos a células tipo M1 y la función citotóxica de las células *natural-killer* (NK)¹³⁸.

Tabla 4. Composición general de los infiltrados de células inmunitarias tumorales en gliomas evaluados por citometría de flujo (CMF) e inmunohistoquímica (IHQ).

Células inmunes infiltrantes	Marcadores	Técnicas empleadas para identificar células inmunes	
		Inmunohistoquímica	Citometría
Proporción de células [ref.]			
Células mieloides			
TAM/microglía	CD68 ⁺	9-50% ¹¹⁶⁻¹¹⁹	0.8% ¹¹⁵
	CD68 ⁺ CD14 ⁺		9% ¹²⁰
	CD11b ⁺ CD14 ⁺		8% ¹²⁰
	CD45 ^{+/-} CD11b ⁺		2% ⁹⁹
Macrófagos	CD45 ⁺⁺ CD11b ⁺		6% ⁹⁹
M1		472/mm ² ¹²⁴	
M2	CD163	287/mm ² ¹²⁴	8% ¹²⁰
		2% ¹¹⁸	
	CD204	368/mm ² ¹²⁴	
MDSC	CD33 ⁺ /HLA-II ⁻		2% ¹²⁵
Monocíticas	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁺⁺ CD15 ⁺		30% ¹²⁷
Granulocíticas	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD14 ^{+/-} CD15 ⁺		48% ¹²⁷
DC			
Mieloides	CD1c ⁺ CD11c ⁺ BDCA-2 ⁻		0.13% ¹¹⁵
Plasmocitoides	CD1c ⁻ CD11c ⁻ BCDA-2 ⁺		0.02% ¹¹⁵
Neutrófilos	anti-MPO	>10/200×HPF ¹²⁸	
Células linfoides			
Células T (CD3⁺)	CD3 ⁺	2-50% ^{118, 131}	1-25% ^{99, 130-132, 141}
Células TCD8⁺	CD8 ⁺	2-78% ^{118, 119, 133, 142}	26% ¹³⁰
		8/mm ² ¹⁴¹	
Células TCD4⁺	CD4 ⁺	0.01-34% ^{115, 133, 135, 141-143}	0.1-29% ^{130, 132, 144}
		12/mm ² ¹⁴¹	
Células Tregs	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ FoxP3		4-15% ^{130, 131, 134, 141, 143}
Células B	MHCII ⁺ CD19 ⁺		0.03-0.7% ^{132, 144}
Células NK	CD56 ^{+/-} CD16 ⁻	58% ¹¹⁹	2% ¹³²

M1: macrófagos de tipo M1; M2: macrófagos de tipo M2; DC; células dendríticas; HPF: campos de alta amplificación (del inglés, *high power fields*); Tregs: células T reguladoras.

Otro subtipo de células mieloides específicamente reclutadas en los tumores cerebrales son las DC, cuya detección y estudio puede verse obstaculizada debido a la ausencia de un marcador celular específico de esta estirpe celular, que a su vez está constituido por un número creciente de subpoblaciones¹¹⁵. En general, las DC se caracterizan por una expresión elevada de moléculas HLA de clase II en ausencia de marcadores de otras líneas celulares (CD14 como típico de monocitos o CD3 específico de linfocitos T). Sin embargo, su fenotipo es muy variable a lo largo de los diferentes estados de maduración y activación de las distintas subpoblaciones de DC identificadas hasta la fecha. Las DC se han investigado más a fondo en el modelo de glioma de ratón GL261. En este modelo animal, se ha demostrado que las DC que infiltran el tumor (CD11c⁺) muestran niveles bajos o indetectables de expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) y son funcionalmente incapaces de estimular células T, mientras que promueven el desarrollo de células T reguladoras (Tregs)¹³⁹. En humanos, el análisis de DC mieloides y plasmocitoides circulantes en la sangre periférica de pacientes con glioma ha mostrado un número reducido respecto al de sujetos sanos^{115, 140}, no existiendo información sobre su distribución en el tejido tumoral.

Finalmente, dentro del linaje mieloides, se han detectado también granulocitos neutrófilos CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺CD16⁺CD15⁺CD62L⁺ (los leucocitos más abundantes en el torrente sanguíneo) en el tejido tumoral de pacientes con GB¹⁴⁵. Los granulocitos neutrófilos son células efectoras esenciales de la respuesta inflamatoria y la defensa frente a los patógenos extra e intracelulares, aunque más recientemente se le atribuyen también otras funciones en la respuesta inmune¹⁰³. Estudios previos han demostrado que los neutrófilos pueden ser reclutados desde la sangre al tejido tumoral como respuesta a distintos factores secretados por las células gliomatosas, produciendo a su

vez localmente sustancias que ayudan a la infiltración del tumor (colagenasa, elastasa), induciendo la proliferación tumoral, además de contribuir a la resistencia al tratamiento y tener efectos pro-angiogénicos, lo cual se encuadra en términos generales en un comportamiento protumoral e inmunosupresor¹⁴⁶. No obstante, a pesar de todo lo anteriormente mencionado, en algunos estudios en distintos tipos de tumores se han referido también fenotipos funcionales de los granulocitos neutrófilos, tanto protumorales como antitumorales, sin que exista información detallada por el momento en los GB¹¹⁴.

Las células inmunes de tipo linfocito que infiltran el tumor son también una constante en el microambiente de los tumores cerebrales⁹⁵, lo cual sugiere que pueda tener un papel importante en el crecimiento, la progresión y/o el control del tumor. Además, a ese nivel, las células linfocíticas establecen interacciones bidireccionales complejas con las células mieloides para ejercer su función a nivel local¹⁰⁴, si bien en tumores del SNC, el infiltrado linfocítico representa únicamente un pequeño porcentaje de todas las células ($\approx 2\%$) del tumor^{99, 135}, y suele estar constituido por linfocitos T y, en menor medida también, por linfocitos B y células NK¹³⁵.

En neoplasias cerebrales dentro de los linfocitos TCD3⁺, se identifican dos subtipos celulares funcionales mayoritarios: los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y las células Th CD4⁺ y, dentro de estas últimas, una subpoblación minoritaria de células Tregs¹³⁵. Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ son componentes cruciales de la inmunidad adaptativa específica del tumor y suelen incluir linfocitos capaces de reconocer y potencialmente destruir las células tumorales¹⁴⁷. A su vez, las células TCD4⁺ son un compartimento muy heterogéneo que incluye linfocitos Th1, Th2, Th17 y Tregs, que desempeñan un papel

muy importante en la regulación del fenotipo de los TAM y en la activación de células T citotóxicas CD8⁺. En este sentido, las células Th1 pueden impulsar la polarización de los macrófagos hacia células de tipo M1 a través de la producción de interferón- γ (IFN γ), mientras que la IL-4 y la IL-13 producidas por las células Th2 orientan la polarización de los macrófagos a células M2. Estudios previos sobre el perfil de activación de los linfocitos que infiltran el tumor en gliomas malignos ha mostrado un predominio de una respuesta inmune T de tipo Th2 asociada a la expresión de citocinas de Th2 (por ejemplo, IL-4 e IL-10), lo cual podría contribuir a explicar el estado "inmunosupresor" a nivel del microambiente de estos tumores¹⁴⁸. De forma similar, en los últimos años, se han referido los resultados de varios estudios en los que se han investigado específicamente las células Tregs CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low} en tumores cerebrales, debido a que estas células desempeñan un importante papel en la regulación de las respuestas inmunitarias mediante la supresión de la proliferación de otras células T presentes en el microambiente tumoral, ya sea a través de mecanismos dependientes del contacto directo célula a célula, ya sea indirectamente mediante la secreción de factores solubles como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante- β , TGF β ¹³⁹. A su vez, a diferencia de los meningiomas, que apenas muestran acumulación de células Tregs, en el GB y en los tumores cerebrales metastásicos sí se ha descrito un infiltrado masivo por células Tregs^{131, 135}. La producción en el microambiente tumoral, de quimiocinas específicas (p. ej. CCL22) y citocinas (p. ej. TGF β) parece estar asociada al reclutamiento preferencial de linfocitos Tregs y la promoción del desarrollo y crecimiento tumoral^{102, 104}. En este sentido, las células Tregs que infiltran el tumor pueden afectar también a la función de los TAM en el microambiente tumoral al favorecer su polarización hacia un fenotipo supresor de tipo M2¹⁰⁴.

La infiltración del tejido tumoral por linfocitos B (HLADR⁺CD19⁺), es infrecuente en el GB, quedando aún por dilucidar el papel específico de estas células en el desarrollo de los tumores cerebrales^{115, 119}. Aun así, en un modelo de GB, Candolfi *et al.*¹⁴⁹ demostraron que las células B pueden actuar como células presentadoras de antígenos para los linfocitos T y así desempeñar un papel crítico en la inmunidad antitumoral mediada por células T en los tumores del SNC.

Dentro de los linfocitos efectores de tipo citotóxico, además de las células TCD8⁺, se observan en el infiltrado tumoral células NK, que desempeñan una función importante en las respuestas inmunitarias innatas antitumorales a través de la inducción de muerte por apoptosis de las células tumorales¹⁵⁰. Las células NK ejercen sus efectos a través de dos vías citotóxicas principales: por un lado, las células NK son ricas en gránulos que contienen perforina y granzima, que una vez liberados, provocan daño de la membrana citoplasmática de las células diana, la entrada de proteínas liberadas por las células NK en dichas células y su posterior muerte por apoptosis. Por otro lado, las células NK expresan de forma constitutiva el ligando de CD95 y producen TNF α y TNF β capaces de unirse a los receptores apoptóticos presentes en las células diana, lo cual conduce también a su muerte por apoptosis. Además, las células NK secretan una variedad de citocinas y quimiocinas (p.ej. IFN γ), que ejercen efectos inmunomoduladores sobre otras células del sistema inmune, incluida la polarización M1 clásica de macrófagos¹⁰⁴. En GB, se ha identificado la presencia de células NK en el tumor, utilizando marcadores como CD56 y CD57, junto a la ausencia de expresión de CD3^{135, 150}. Así mismo, su función supresora local se ha demostrado, tanto en estudios realizados *in vitro*¹⁵¹, como *in vivo*¹⁵², sobre neoplasias cerebrales primarias (p.ej.

meningioma, glioma...), como metastásicas^{135, 150}. Sin embargo, el nivel de infiltración tumoral por células NK es habitualmente bajo, y la funcionalidad de estas células está a menudo afectada y disminuida por factores liberados localmente por el propio tumor y/u otras células inmunosupresoras¹⁵⁰.

3.3 Impacto clínico del estado del sistema inmune en el comportamiento del tumor

Los estudios de la inmunidad tumoral sugieren que el cerebro está equipado y/o puede reclutar células con potencial para actuar contra los tumores cerebrales. Así, la presencia de infiltrados inflamatorios en tumores del SNC humanos se ha relacionado con un mejor pronóstico de la enfermedad y una mejor evolución del paciente^{153, 154}. Sin embargo, estas funciones pueden verse afectadas por elementos pro-tumorales del propio microambiente tumoral, lo cual puede contribuir a explicar resultados aparentemente contradictorios que relacionan la infiltración de células inmunitarias con un peor pronóstico de la enfermedad¹⁵³. Precisamente en este sentido, varios estudios realizados sobre las células de la microglía y los macrófagos cerebrales presentes en el tumor de pacientes con glioma han mostrado un fenotipo protumoral de estas células asociado con un microambiente inmunosupresor, que contribuye a promover el crecimiento e invasión tumoral¹⁵⁵. No obstante, algunos autores han referido la posibilidad de revertir este fenotipo M2 a un fenotipo M1, mediante inhibición del receptor del factor 1 estimulante de colonias (CSF-1R), asociado incluso con la regresión de gliomas de alto grado ya establecidos¹⁵⁶. En su conjunto, estos hallazgos indican que el comportamiento a nivel local de los TAM a menudo se ajusta a las distintas condiciones microambientales del tejido que pueden afectar al fenotipo y función de estos y potencialmente a otras células del sistema inmune^{157, 158}. En base a estos

estudios se han planteado, como posible opción terapéutica, la reeducación de las células de la microglía/TAM, y a que estas podrían tener un efecto antitumoral beneficioso sobre la evolución de la enfermedad. De forma similar, en los gliomas se ha constatado que las MDSC asociadas al tumor expresan niveles elevados de IL-10 y un fenotipo M2 inmunosupresor, promotor de tumor, lo cual apoyaría la hipótesis que confiere a las MDSC un papel relevante también en la polarización en el microambiente tumoral en los gliomas¹⁵⁹. En este sentido, algunos autores han correlacionado la presencia de MDSC en el infiltrado tumoral con un peor pronóstico^{125, 160}, abriendo así nuevas perspectivas en el tratamiento de estos tumores mediante dosis bajas de quimioterapia, que pueden actuar directamente sobre esta población celular¹⁶¹.

Hoy se cree que los granulocitos neutrófilos que infiltran el tejido tumoral en los GB desempeñan un papel fundamental en la progresión del tumor, promoviendo tanto el crecimiento tumoral como la angiogénesis, por lo que desde el punto de vista terapéutico, esta población celular se ha convertido también en una diana de nuevas terapias dirigidas¹²⁸. En este sentido, ratios de neutrófilos/linfocitos superiores a 4 presentes en astrocitomas que expresan el gen *IDH1* de tipo silvestre se han asociado con un peor pronóstico, tanto cuando se evalúa de forma previa al tratamiento, como después de una segunda cirugía, y tras la administración de quimioterapia con temozolomida y/o radioterapia¹⁶². Cabe señalar que los gliomas con *IDH1*-mutado tendrían una supervivencia más larga que aquellos que presentan *IDH1* no mutado asociado a menor infiltración tumoral por granulocitos neutrófilos¹⁶³.

Respecto a las distintas poblaciones de células linfoides, varios estudios han analizado la relación existente entre la presencia de infiltrados de células T en el tumor

y la evolución clínica de la enfermedad, con resultados contradictorios¹⁶⁴. Sin embargo, en general, niveles más elevados de linfocitos T CD8⁺ se han relacionado con una mayor actividad antitumoral y una supervivencia más prolongada^{141, 142, 150}, mientras que los niveles más elevados de células T CD4⁺ (en particular de algunas subpoblaciones de células Th y las células Tregs) se han asociado con un fenotipo pro-tumoral que favorece el desarrollo del tumor^{134, 165}. A modo de ejemplo, algunos autores han descrito la existencia de una fuerte correlación en GB entre un fenotipo tumoral inmunosupresor y la presencia de linfocitos Tregs en el microambiente tumoral, mientras que otros han demostrado que la infiltración tumoral por células Tregs se correlaciona con el mayor grado histológico del tumor¹³⁰. Por el contrario, la infiltración tumoral por células NK se ha asociado en GB con un efecto antitumoral más pronunciado, una citogenética más favorable y un mejor curso clínico de la enfermedad^{135, 153}. Finalmente, la presencia de células B en el tejido tumoral podría tener un efecto paradójico, ya que en algunos estudios las células B se han relacionado con una función supresora del desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral, regulando directamente las funciones efectoras de los macrófagos a través de la producción de IL-10, lo cual podría promover un fenotipo de macrófago M2 y, por lo tanto, el desarrollo y crecimiento tumoral¹⁰⁴.

Actualmente, está bien establecido que las células del sistema inmune del infiltrado tumoral desempeñan un papel importante en el desarrollo y el control de los tumores del SNC y de otros tejidos¹³⁹. Por todo ello, en la actualidad los esfuerzos se centran en la identificación y caracterización de las células inmunes presentes dentro del tumor, con el propósito de lograr entender sus efectos sobre el comportamiento del tumor y, a la vez, de identificar nuevas vías terapéuticas^{87, 166, 167}. Sin embargo, a nivel

individual, cada tumor puede mostrar un perfil inmune único, cuyo significado solo podremos descifrar completamente mediante la evaluación numérica y funcional de esas células inmunes, como complemento del estudio genético/genómico del tumor, aspectos que son esenciales para poder establecer en el futuro con elevada precisión el tratamiento más adecuado para cada paciente.

Hipótesis de trabajo y objetivos

El GB es la neoplasia maligna de células gliales más frecuente del SNC^{168, 169}. Desde el punto de vista clínico y biológico, el GB incluye un grupo heterogéneo de tumores con características histopatológicas comunes, pero un comportamiento clínico, localización, genética¹⁷⁰, y microambiente tumoral¹⁷¹ heterogéneos, y una respuesta impredecible a las limitadas opciones terapéuticas disponibles, lo que conduce a un pronóstico adverso con una supervivencia media a los 5 años tras el diagnóstico, inferior al 10%¹⁶⁹.

Las distintas clasificaciones de la OMS se han basado durante muchos años en criterios exclusivamente histológicos. Más recientemente, en estas clasificaciones, junto a los criterios histológicos convencionales, se han incluido criterios moleculares con un peso progresivamente creciente¹⁶⁸. A pesar de la incorporación de los criterios moleculares, en la actualidad la clasificación de la OMS de los tumores de SNC no permite distinguir subgrupos de GB con diferente pronóstico^{7, 168, 172}, o con implicaciones terapéuticas relevantes⁶⁰. Entre las anomalías genéticas que presentan los GB, reconocidos por su relevancia pronóstica, se incluyen el perfil de CNA (pérdidas y ganancias) de las células tumorales presentes en un porcentaje importante de los tumores^{22, 60, 173}, mutaciones puntuales, amplificación génica y deleciones intragénicas, además de otras alteraciones presentes a nivel de ARN y relacionadas con distintos GEP. Aun así, sigue siendo limitada y controvertida la información sobre la posible relación existente en GB entre las alteraciones genéticas del tumor, sus GEP y la evolución clínica de la enfermedad⁴⁹. Por otra parte, las distintas propuestas de clasificación de los GB referidas en las publicaciones científicas existentes, en las que se emplean los perfiles de expresión génica (de forma aislada o combinado con el análisis de otras alteraciones

genéticas) para la definición de los distintos grupos de GB⁵⁸⁻⁶⁰, han resultado demasiado complejas y costosas para poder ser aplicadas en la rutina diagnóstica. Finalmente, pese a los avances en el conocimiento de las alteraciones genómicas de estos tumores, el conocimiento de los mecanismos involucrados en la patogénesis del GB sigue siendo incompleto y limitado, lo que dificulta aún más la incorporación en la rutina diagnóstica de estos tumores.

Precisamente, en el intento de comprender mejor los mecanismos implicados en el comportamiento tan heterogéneo que caracteriza a los GB, ha adquirido especial relevancia el conocimiento de las distintas interacciones que establecen las células tumorales con su microambiente y, particularmente, con las células inmunes (mieloides y linfoides) que infiltran el tumor, y su papel en la vigilancia anti-tumoral¹⁷⁴. Hoy sabemos que, en las primeras fases del desarrollo del tumor, las células neoplásicas pueden desencadenar una respuesta inflamatoria con infiltración local de células de la inmunidad innata¹¹². Sin embargo, el microambiente del GB se convierte progresivamente en un ambiente inmunosupresor, lo cual conduce a la generación de tolerancia por parte del sistema inmune, que facilita el crecimiento y la progresión del tumor¹⁶⁷. Estudios previos han identificado la presencia de distintos tipos de células del sistema inmune en el infiltrado tumoral en los GB, incluyendo TAM, linfocitos T, B y NK, células Tregs y MDSC. No obstante, la información sobre la composición celular del infiltrado inmune de los GB sigue siendo relativamente escasa, debido en parte a limitaciones técnicas en lo que respecta al número de marcadores y poblaciones celulares que se han analizado simultáneamente, y al pequeño número de muestras tumorales incluidas en los estudios disponibles^{118, 175}. El reciente desarrollo y disponibilidad de citómetros de flujo, capaces de evaluar simultáneamente un gran

número de marcadores y poblaciones de células inmunes¹⁷⁶, posibilita que hoy día podamos llevar a cabo una caracterización mucho más detallada de las distintas poblaciones de células inmunes presentes en el microambiente tumoral en los GB.

En este contexto, en el que muchos de los genes alterados en el GB son diana de distintas vías de señalización celular estratégicas (p.ej. vías cuya alteración puede estar asociada con una pérdida del control del funcionamiento celular normal) con implicaciones, tanto en la interacción de la célula tumoral alterada con otras células, como en la creación de un microambiente tumoral específico que puede condicionar la evolución del tumor y la enfermedad, adquieren especial relevancia aquellos estudios que permiten combinar el análisis genético del tumor, con el conocimiento del microambiente inmune, para mejorar nuestra comprensión de la patogenia de la enfermedad y de los criterios más relevantes que deben ser empleados para una mejor clasificación (pronóstica) de los pacientes con GB.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis doctoral nos planteamos como objetivo **general**:

Analizar las características genéticas y celulares del GB, incluido el microambiente del tumor y los componentes inmunes presentes en el mismo, con el fin de determinar su posible utilidad a la hora de estratificar a los pacientes en grupos pronósticos en función de dichas características genéticas e inmunes.

Para ello hemos definido tres **objetivos específicos**:

1. Identificar la presencia e incidencia de amplificaciones y/o deleciones génicas a nivel del genoma tumoral del GB y determinar su posible impacto en la

supervivencia de los pacientes para ser utilizados en el futuro en la clasificación de los GB.

2. Analizar el perfil de expresión de aquellos genes amplificados con mayor frecuencia en GB, tanto en el tejido tumoral como en tejido cerebral no tumoral, y determinar su posible relación con el comportamiento clínico del tumor.
3. Diseñar e implementar una estrategia de análisis detallada de la composición celular de los GB y su microambiente inmune, mediante la técnica de CMF, y explorar su posible relación con las alteraciones genéticas subyacentes y el comportamiento clínico y pronóstico de la enfermedad.

Material, métodos y resultados

En esta sección se describen los grupos de pacientes analizados, así como los materiales y métodos empleados para su estudio y los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos propuestos en esta tesis doctoral. La exposición de los materiales y métodos utilizados, así como de los resultados alcanzados, se recogen en este apartado en forma de tres artículos científicos originales publicados en revistas de alto impacto, los cuales estarán precedidos de un breve resumen en castellano que facilite una rápida revisión de su contenido.

Artículo 1: “Estratificación pronóstica de adultos con glioblastoma multiforme primario según el perfil de amplificación génica del tumor.”

María González-Tablas¹, Inês Crespo^{2,3}, Ana Luísa Vital^{2,3}, Álvaro Otero⁴, Ana Belén Nieto⁵, Pablo Sousa⁴, María Carmen Patino-Alonso⁵, Luis Antonio Corchete⁶, Hermínio Tãõ⁷, Olinda Rebelo⁸, Marcos Barbosa^{7,9}, Maria Rosário Almeida², Ana Filipa Guedes², María Celeste Lopes^{2,3}, Pim J. French¹⁰, Alberto Orfao^{1,11*}, María Dolores Tabernero^{1,11*}

¹ Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL-IBSAL), Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto Carlos III, Madrid, España; ² Centro de Neurociencias y Biología celular, Universidad de Coimbra, Portugal; ³ Facultad de Farmacia, Universidad de Coimbra, Portugal; ⁴ Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario e Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL), España; ⁵ Departamento de estadística, Universidad de Salamanca, España; (6) Departamento de Hematología, Hospital Universitario, IBSAL, IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, España; ⁷ Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario de Coimbra, Portugal; (8) Laboratorio de Neuropatología, Servicio de Neurología, Hospital Universitario de Coimbra, Portugal; ⁹ Facultad de medicina, Universidad de Coimbra; ¹⁰ Departamento de Neurología, Erasmus MC, Rotterdam, Países Bajos; and ¹¹ Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL) Salamanca, Spain. *Ambos autores han contribuido de manera equitativa en este trabajo y deben ser considerados como último autor.

Oncotarget (2018)

DOI: [10.18632/oncotarget.25562](https://doi.org/10.18632/oncotarget.25562)

Introducción: El GB es un tumor con gran heterogeneidad genómica. Sin embargo, la utilización de la información genética y molecular de las células tumorales en la clasificación y/o estratificación pronóstica de los GB sigue siendo limitada, debido a la gran complejidad de los hallazgos genéticos y el pronóstico adverso de la mayoría de los pacientes.

Objetivo: En este trabajo proponemos un modelo de estratificación pronóstica para los GB primarios del SNC, basado en los perfiles de amplificación de genes presentes en el tumor, que podría implementarse fácilmente en la rutina diagnóstica y mejorar el manejo clínico y tratamiento de estos pacientes.

Material y métodos: La evaluación de los perfiles de amplificación génica tumoral se llevó a cabo prospectivamente en 80 GB utilizando técnica de *arrays* de polimorfismos de nucleótido único (SNPs, del inglés, *single nucleotide polymorphisms*); los resultados obtenidos se validaron en una serie externa de 267 GB, a partir de datos disponibles en repositorios genómicos públicos.

Resultados: En el 45% de los GB estudiados detectamos amplificación de uno o más genes. Con mayor frecuencia ésta afectó a la región cromosómica 7p11.2 que contiene al gen *EGFR*, encontrándose la amplificación de esta región de forma aislada (18%) o en combinación con la amplificación de secuencias de ADN de otras regiones cromosómicas (10% de los casos). Las secuencias de ADN amplificadas de las otras regiones cromosómicas correspondían a regiones localizadas en los cromosomas 12q (10%), 4q12 (7%) y 1q32.1 (4%). De acuerdo con los perfiles de amplificación génica observados, agrupamos los GB en: i) tumores sin amplificación génica (55%); ii) tumores con amplificación del gen *EGFR* en el cromosoma 7p (con o sin amplificación de otras

regiones cromosómicas) (38%); y iii) GB con secuencias de ADN amplificadas únicas (11%), o múltiples (6%) en regiones cromosómicas distintas del cromosoma 7p. Desde el punto de vista pronóstico, estos perfiles de amplificación mostraron un impacto significativo en la supervivencia global de los pacientes con GB ($p < 0,001$), mostrando los pacientes que presentaban amplificación del gen *EGFR* (aislada o en combinación con otras amplificaciones genéticas) una mayor supervivencia.

Conclusión: La clasificación propuesta permite la estratificación pronóstica de los GB a partir del perfil de amplificación génica (GAP, del inglés *gene amplification profile*) del tumor, constituyendo un sistema pronóstico relativamente simple de implementar en la rutina diagnóstica.

Prognostic stratification of adult primary glioblastoma multiforme patients based on their tumor gene amplification profiles

María González-Tablas¹, Inês Crespo^{2,3}, Ana Luísa Vital^{2,3}, Álvaro Otero⁴, Ana Belén Nieto⁵, Pablo Sousa⁴, María Carmen Patino-Alonso⁵, Luis Antonio Corchete⁶, Hermínio Tão⁷, Olinda Rebelo⁸, Marcos Barbosa^{7,9}, Maria Rosário Almeida², Ana Filipa Guedes², María Celeste Lopes^{2,3}, Pim J. French¹⁰, Alberto Orfao^{1,11,*} and María Dolores Tabernero^{1,11,*}

¹Centre for Cancer Research (CIC IBMCC-CSIC/USAL), Department of Medicine, CIBERONC, University of Salamanca, Salamanca, Spain

²Centre for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

³Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁴Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario e Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

⁵Department of Statistics, University of Salamanca, Salamanca, Spain

⁶Departamento de Hematología, Hospital Universitario, IBSAL, IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain

⁷Neurosurgery Service, University Hospital of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁸Neuropathology Laboratory, Neurology Service, University Hospital of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁹Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

¹⁰Department of Neurology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

¹¹Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

* Both authors have equally contributed to this work and should be considered as last authors

Correspondence to: María Dolores Tabernero, **email:** taberner@usal.es

Keywords: glioblastoma; classification; subtypes; gene amplification; survival

Received: February 28, 2018

Accepted: May 14, 2018

Published: June 15, 2018

Copyright: González-Tablas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Several classification systems have been proposed to address genomic heterogeneity of glioblastoma multiforme, but they either showed limited prognostic value and/or are difficult to implement in routine diagnostics. Here we propose a prognostic stratification model for these primary tumors based on tumor gene amplification profiles, that might be easily implemented in routine diagnostics, and potentially improve the patients management. Gene amplification profiles were prospectively evaluated in 80 primary glioblastoma multiforme tumors using single-nucleotide polymorphism arrays and the results obtained validated in publicly available data from 267/347 cases. Gene amplification was detected in 45% of patients, and chromosome 7p11.2 including the *EGFR* gene, was the most frequently amplified chromosomal region – either alone (18%) or in combination with amplification of DNA sequences in other chromosomal regions (10% of cases). Other frequently amplified DNA sequences included regions in chromosomes 12q(10%), 4q12(7%) and 1q32.1(4%). Based on their gene amplification profiles, glioblastomas were subdivided into: i) tumors with no gene amplification (55%); ii) tumors with chromosome 7p/*EGFR* gene amplification (with or without amplification of other chromosomal

regions) (38%); and iii) glioblastoma multiforme with a single (11%) or multiple (6%) amplified DNA sequences in chromosomal regions other than chromosome 7p. From the prognostic point of view, these amplification profiles showed a significant impact on overall survival of glioblastoma multiforme patients ($p > 0.001$). Based on these gene amplification profiles, a risk-stratification scoring system was built for prognostic stratification of glioblastoma which might be easily implemented in routine diagnostics, and potentially contribute to improved patient management.

INTRODUCTION

Primary glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and malignant subtype of glial tumors [1]. From the clinical and biological point of view, GBM includes a rather heterogeneous group of tumors that vary by site of origin, histopathological features, tumor microenvironment [2] and genetics [3]. They are usually resistant to radio/chemotherapy and show overall survival (OS) rates of a few months to years, making them unvariably lethal [4, 5]. Criteria used for the histological classification and grading of GBM have been recently revised in the 4th World Health Organization (WHO) classification of GBM [1]; however, this classification still fails in distinguishing subgroups (or variants) of primary GBM that display clearly distinct clinical and biological behaviours, despite sharing similar histopathological features [6–9].

Besides histopathology, molecular genetics data has also confirmed the high heterogeneity of GBM, both at the intertumoral and intratumoral levels [3, 10–12]; in addition, molecular genetics data also proved useful for improving the diagnosis, classification, and prognostic stratification of GBM [13, 14], with therapeutic implications [14–16]. However, despite all advances achieved via the study of the methylation status, gene mutations (e.g. *IDH1* or *PT53* genes) [17] and affected oncogenic pathways [11, 18–20], the precise mechanisms involved in the pathogenesis of GBM still remain far from being fully understood. In turn, routine implementation of molecular genetics into the diagnostic classification of GBM still remains limited, due to the complexity of the genetic findings involved.

Among other genetic abnormalities, the copy number aberration (CNA) profile of tumor cells, over the copy number variation (CNV) of individual patients, has been recognized [21–24] as a useful prognostic tool in GBM [14]. Thus, some copy number aberrations involving one or multiple genes that affect a significant fraction of the tumors, (e.g. CNA associated with either gains of chromosome 7 and/or amplification of the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene [18], and losses of DNA sequences in chromosome 10 [19], together with other less frequent alterations involving DNA sequences in chromosomes 12q13–15 [25], 4q and 1q [26], have all been associated with the outcome of GBM patients. Despite this, risk stratification of GBM

into classical and non-classical GBM, based on gene expression profiling (GEP) data, was first proposed [27]. Later on, Phillips et al [13] defined three molecular subtypes of GBM according to a combination of GEP data and numerical alterations of chromosomes 7 and 10: proneural, proliferative and mesenchymal GBM. This classification was subsequently redefined by the Cancer Genome Atlas Consortium (TCGA) [14] into four subtypes – proneural, proliferative, mesenchymal and neural GBM, using a combination of GEP data and CNA, together with the pattern of somatic mutations. Despite overlapping data is used in the later two classifications, both approaches are not equivalent, at the same time they are rather complex to be reproducibly applied in routine laboratory diagnostics. In addition, the prognostic impact of both approaches remains controversial because e.g. the proneural subgroup of Philips [13] has a longer survival, while proneural tumors defined according to the TCGA classification [14], have a poorer outcome. In turn, despite *EGFR* amplification is a defining event for the classical subtype of GBM, in the TCGA classification it appears in >95% of the neural and mesenchymal tumor subtypes, but also in 54% of the proneural subtype; similarly, the same *EGFR* mutations (e.g. the *EGFRvIII* variant) can also be detected across all above subtypes of GBM; in addition, neither the criteria used to define the proneural class based on focal amplification of the 4q12 locus harboring the *PDGFRA* gene (with or without *EGFR* amplification), nor the evaluation of the expression of the *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* and *SLC12A5* genes, are currently applied for routine diagnostic classification of GBM. Altogether this hampers fast and reproducible risk-stratification of GBM patients at diagnosis, based on this classification.

Here we investigated the gene amplification profiles (GAP) across the whole tumor genome of a series of 80 GBM tumors, as detected by high-density single-nucleotide polymorphism (SNP)-arrays, and evaluated their impact on overall survival (OS) of GBM patients. Based on the results obtained, a GAP-based risk-stratification model was built and validated in a series of 267 GBM tumors from a total of 7 GBM series publicly available at the GEO and ArrayExpress databases and/or whose data was kindly provided by the authors [15, 24, 28–32], in addition to our own cases.

RESULTS

Gene amplification profiles and chromosomal regions involved in GBM

SNP-arrays showed CNA containing > 7 DNA copies of the same DNA sequence for ≥ 1 chromosome/ chromosomal region in all (80/80) cases analyzed from series 1. In the majority of patients (45/80; 56%) such CNA involved genetic amplification of DNA sequences from ≥ 1 chromosomal region (Table 1 and Figure 1). As expected, DNA sequences at chromosome 7p11.2 containing the *EGFR* gene, were the most frequently amplified sequences (30/80 cases; 38%), followed by DNA sequences at the 12q (14/80; 18%), 4q (8/80; 10%) and 1q (5/80; 6%) chromosomal regions.

Amplification of DNA sequences at chromosome 7p11.2 was found either alone (17/80; 21%) or in combination with amplification of DNA sequences at other regions in chromosomes 1q, 4q, 5q, 6q, 11p, 11q, 12q, 17p and 17q (13/80; 16% of cases) (Table 1). The most frequent combination of simultaneously amplified DNA sequences at chromosomal regions involving 7p11.2 were those of 7p and 12q (7/80 cases; 9%) and of 7p and 11p (2/80 cases; 3%) (Table 1).

Isolated amplification of DNA sequences at chromosomal regions other than 7p11.2 was found in 10/80 cases (13%); this included isolated amplification of 4q12 (where the *PDGFRA* gene is coded) in 4/80 cases (5%), 12q14.1 (where the *CDK4* gene is coded) in 3/80 cases (4%), 1q32.1 (this chromosomal region contains the *MDM4* gene) in another 2/80 tumors (3%) and 16q in one tumor (1%) without any annotated gene being coded in the amplified DNA sequences from this later chromosomal region (Table 1).

In turn, genetic amplification at 12q was detected in 14/80 cases (18%) including isolated amplification in 3 GBM and combined 12q gene amplification with gene amplification at other chromosome regions (1p, 1q, 4q, 11p, 11q, 7q, or 17q) in 11 tumors (Table 1), including amplification at chromosome 7p in 7 cases (9%). Gene amplification at 4q was found in 8/80 cases (10%) either alone (4/80; 5% or in association with amplification of DNA sequences at the 12q and/or 7p (4/80; 5%) chromosomal regions (Table 1).

Overall, coexistence of genetically amplified DNA sequences at ≥ 2 chromosomal regions in the same tumor (median of 2 altered chromosomal regions; range: 2-4 regions) was found in 18 cases (23%). In 13 of these 18 tumors, the *EGFR* gene was involved (Table 1). Of note, gene amplification involving regions at chromosomes 7q (4%), 11p (3%), 17q (3%), 5q (1%), 6q (1%), 11q (1%) and 17p (1%) included variable chromosomal patterns and numbers of genes involved (Table 1 and Table 2). Although gene amplification was frequently associated with chromosomal gains (polyploidy), there

were also cases with polyploidies in the absence of gene amplification and vice versa.

Tumors with isolated amplification of DNA sequences at a single chromosomal region had a median of 9 genes involved (range: 1 to 40 genes). Gene amplification at 7p11.2 included the smallest number of affected genes (median: 5 vs 16 genes for gene amplification involving DNA sequences at chromosomes 12q, 1q and 4q). In turn, cases showing amplified DNA sequences at several chromosomal regions had a median of 19 genes involved (range: 1 to 45 genes). The most commonly (>5% of cases) amplified genes per chromosomal region included: i) 9 genes at chromosome 1q32.1 (*SOX13*, *ETNK2*, *REN*, *KISS1*, *GOLT1A*, *PLEKHA6*, *PIK3C2B*, *MDM4* and *LRRN2*); ii) 4 genes at chromosome 4q12 (*SCFD2*, *FIP1L1*, *PDGFRA* and *KIT*); iii) 5 genes in chromosome 7p11.2 (*EGFR*, *LANCL2*, *VSTM2A*, *VOPPI* and *SEC61G*), and; iv) multiple genes at chromosome 12 which had 3 cytobands involved, i.e. 12q14.1 (*CDK4*, *METTL1*, *CYP27B1*, *AVIL*, *CTDSP2*, *METT21B*, *AGAP2*, *OS9*, *TSMF*), 12q13.3 (*B4GALNT1*, *KIF5A*, *PIP4K2C*, *DTX3*, *SLC26A10*, *MARS*, *DCTN2*, *ARHGEF25*) and 12q15 (*ATP23*, *MDM2*, *CPM*) (Table 3). When individually considered, the *EGFR* gene (38%) together with the *LANCL2* gene (23%), coded also at chromosome 7p11.2, were the two most frequently amplified genes (Table 3). Of note, amplification of none of the genes detected here had been previously described in healthy individuals [33] and/or publicly available GBM databases.

Classification of GBM tumors based on their gene amplification profiles (GAP)

Based on the presence of gene amplification, their specific subtype and the number of chromosomal regions affected by gene amplification (Figure 1), GBM tumors from group 1 (series 1) were divided into five different subgroups: i) tumors which had no gene amplification (n=35; 44%); ii) tumors with isolated amplification of DNA sequences at chromosome 7p including the *EGFR* gene (n=17; 21%); iii) GBM with isolated amplification of DNA sequences at a chromosomal region different from chromosome 7p (n=10; 13%); iv) tumors with amplifications of DNA sequences from multiple (≥ 2) chromosomal regions including that of the *EGFR* gene (n=13; 16%), and; v) tumors with amplification of DNA sequences at ≥ 2 chromosomal regions which did not include amplification of the *EGFR* gene (n=5; 6%) (Table 4 and Figure 2).

The above GAP were further investigated in the other 7 series of GBM used for validation purposes, for a total of 267 primary GBM patients (Table 4). Around half of these cases -156/267 (58%)- did not show genetic amplification at any of the chromosomal regions investigated (Table 4); in contrast, 69 (26%) tumors had gene amplification at

Table 1: Major subsets of GBM that carried different gene amplification profiles, as identified in our series (series 1) of GBM patients (n=80) grouped according to the location, type and number of chromosomal regions involved (n=45/80 tumors)

Tumor group		Tumor ID	Amplified chromosome(s)	N. of amplified chromosomal band(s)/genes	Amplified Chromosomal bands
Gene amplification at a single chromosomal region (n=27)	<i>EGFR gene</i> involved (n=17;21%)	G94		2/4	7p11.2/7p12.1 [#]
		G55		2/2	
		G91		1/2	
		G80		1/3	
		G72		1/2	
		G68		1/2	
		G67		1/1	
		G56		1/2	
		G44 ⁹	7p	1/3	
		G40 ⁹		1/3	7p11.2
		G37 ⁹		1/2	
		G30 ⁹		1/1	
		GBM3 ⁹		1/17	
		GBM7 ⁹		1/3	
		GBM11 ⁹		1/7	
		GBM12 ⁹		1/25	
		GBM17 ⁹		1/2	
	<i>EGFR gene</i> not involved (n=10;13%)	G73		3/35	4q11/4q12/4q13.3
		G12		1/29	4q11 [#] /4q12
		GBM1 ⁹	4q	1/16	4q12
		GBM14 ⁹		1/7	4q12
		G51 ⁹		2/14	12q13.3/12q14.1
		G46 ⁹	12q	2/5	12q14.1-q14.3/12q15
		G25 ⁹		1/8	12q14.1
		G79		1/12	1q32.1
		G54	1q	1/18	
		G10	16q [#]	1/0	16q12.1-q12.2
Gene amplification at multiple chromosomal regions (n=18)	<i>EGFR gene</i> & other amplicons involved (n=13;16%)	G39 ⁹	7p, 12q	1/2, 2/9	7p11.2/12q13.3/12q14.1
		G41		1/4, 2/11	7p11.2/12q14/12q15
		G53 ⁹		3/6, 1/2	7p11.2/7p21.3/7p22.1/12q15
		G70		1/1, 2/20	7p11.2/12q13.3/12q14.1
		G83	1q, 7p	1/16, 1/1	1q32.1/7p11.2
		G65		1/26, 1/12	
		GBM19 ⁹	7p, 7q	4/5	7p21/7p12.3/7p11.2/7q22.3
		G23 ⁹	7p, 11p	1/2, 1/17	7p11.2/11p13
		GBM4 ⁹	1q,7p,12q	1/18, 1/6, 2/11	1q32.1/7p11.2/12q13.3/12q14.1
		G82	4q, 7p, 12q	2/6, 1/1, 3/23	4q12/4q13.3/7p11.2/12q13.12-q13.13/12q13.3/12q14.1/12q15
		G90	5q [#] , 6q [#] , 7p	1/1	5q34/6q25/7p11.2
		G81	7p, 17p, 17q	1/2, 2/11	7p11.2/17p13.1/17q25.1
		G71	7p, 11p, 11q, 12q	2/5, 3/16, 2/19	7p11.2/7p12.1/11p15.3/11p11.2 [#] /11q13.3/11q25/12q13.3/12q14.1

(Continued)

Tumor group	Tumor ID	Amplified chromosome(s)	N. of amplified chromosomal band(s)/genes	Amplified Chromosomal bands
<i>EGFR</i> gene not involved (n=5;6%)	GBM13 ^a	4q, 12q	1/7, 1/11	4q12/12q14.1
	GBM22 ^a		1/19, 2/20	4q12/12q13.3/12q14.1
	G08 ^b	1p, 7q	3/30, 1/7	1p12/1p13/1p21/7q21.2-q21.3
	G88	4q, 7q, 12q	2/13, 1/3, 4/30	4q12/4q13.3/7q31.2/12q13.3/12q14.1/12q15/12q21.1
	G89	1p, 12q, 17q	1/3, 2/21, 3/6	1p36.21/12q13.3/12q14.1/17q11/17q12 [#] /17q21/17q22 [#] /17q24

ID: Case identification code. Most frequently involved genes per chromosomal band included: 1q32.1, *MDM4*; 4q12, *PDGFR4*; 12q14.1, *CDK4*; 12q15, *MDM2*; 7q31.2, *MET*. ^a: Amplified chromosomal region without any annotated gene in it; ^b: *EGFR* gene mutation studied in this sample.

chromosome 7p11.2 amplification –46/267 cases (17%) with isolated *EGFR* amplification and 23/267 cases (9%) showed amplification of DNA sequences at multiple chromosomal regions including amplification of the *EGFR* gene – (Table 2 and Table 4). Similarly to what was observed in the test series, gene amplification at 7p, in association with gene amplification at chromosome 12q, was found in 6 tumors (2%) and gene amplification at chromosome 7p together with amplification of DNA sequences at chromosomal regions other than 12q was found in another 17 cases (6%), –e.g. gene amplification at the 1q or 4q chromosomal regions in 3/267 (1.1%) and 4/267 (1.5%) cases, respectively, and at 7q or 3q in 3/267 (1.1%) and 2/267 (0.8%) tumors, respectively – (Table 2). DNA sequences from other chromosomal regions which were also found to be amplified at lower frequencies than those amplified at 7p, included DNA sequences at chromosomes 12q (10/267; 4%) and 4q (6/267; 2%) (Table 2). Genetic amplification at other chromosomal regions such as 7q, 12p and 13q was found in two tumors each, and gene amplification at the 6p, 8q, 15q and 17q chromosomal regions was found in a single tumor each (Table 2).

Upon merging the test and validation series (series 1 to 8), the following distribution into the 5 subgroups of GBM defined by their distinct GAP (Table 4), was found: 191 cases (55%) had no gene amplification (group 1), 63/347 cases (18%) showed isolated amplification of *EGFR* (group 2); 37/347 (11%) displayed isolated amplification of genes other than *EGFR* (group 3); 36/347 (10%) had genetic amplification at multiple chromosomal regions, including amplification of the *EGFR* gene (group 4); and 20/347 (6%) showed multiple amplified DNA sequences at ≥ 2 distinct chromosomal regions, which did not include amplification of the *EGFR* gene (group 5) (Table 4).

Prognostic impact of gene amplification profiles in GBM

From the prognostic point of view, the above defined GAP showed a significant impact on OS of

GBM patients, both in the test series (series 1) alone ($p < 0.001$; Figure 3A), and in the whole cohort (series 1-8; $p < 0.001$) (Figure 3C). In detail, cases that did not show gene amplification or that displayed amplification of the *EGFR* gene (alone or in combination with amplification of genes in other chromosomal regions) (groups 1, 2, and 4, respectively) showed a significantly better outcome than patients with isolated amplification of genes other than the *EGFR* gene (group 3) and cases with amplification of multiple chromosomal regions which did not involve the *EGFR* region (group 5): median OS of 14, 18 and 14 months vs 6 ($p = 0.001$, $p < 0.001$ and $p = 0.007$, respectively) and 8 months ($p = 0.03$, $p < 0.001$ and $p = 0.003$, respectively) in the test series alone, and of 14, 18 and 14 months vs 8 ($p = 0.03$, $p = 0.003$ and $p = 0.16$, respectively) and 8 ($p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p = 0.001$, respectively) months in the whole cohort, respectively (Figure 3, panels A and C, respectively). When cases were re-grouped according to i) the absence of gene amplification or presence of *EGFR* gene amplification vs ii) occurrence of other GAP, the prognostic impact of the re-grouped GAP was enhanced, both when the test series alone and the whole cohort of patients analyzed, were considered: median OS rates of 15 vs 6 months ($p < 0.001$) and of 15 vs 8 months ($p < 0.001$), respectively (Figure 3 panels B and D, respectively). Subsequent multivariate analysis of prognostic factors showed that the tumor GAP ($p < 0.001$), together with the administration of chemotherapy ($p < 0.001$) were the best combination of independent prognostic factors to predict patient OS (Table 5).

DISCUSSION

Despite histopathology remains the gold standard for the diagnosis of GBM, it provides limited information about patient outcome. Consequently, new classifications have been proposed in recent years for GBM in which molecular genetics data derived from chromosomal alteration profiles, DNA mutational status and GEP data, is used for the definition of tumor subgroups of

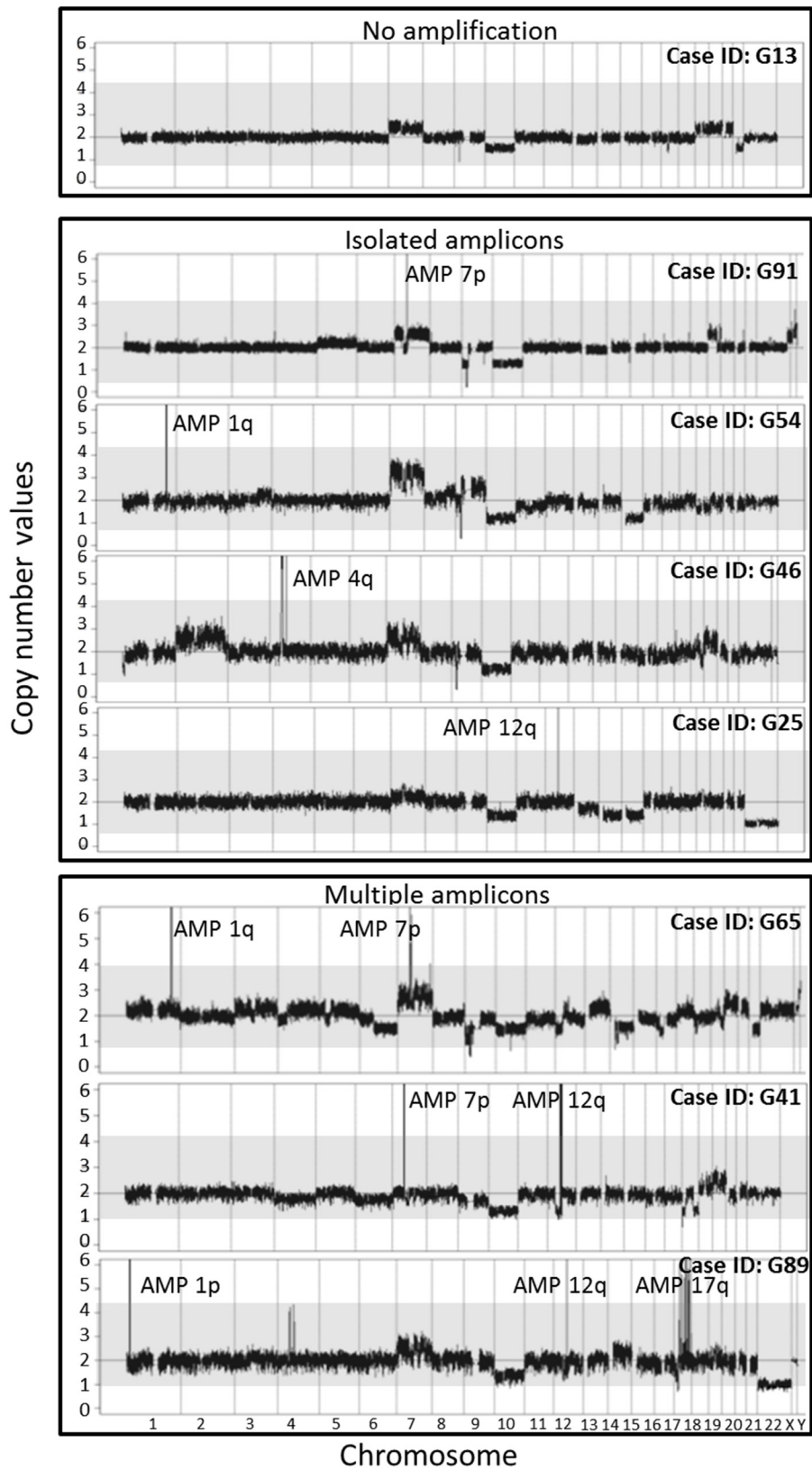


Figure 1: Illustrating examples of the cytogenetic profiles representative of the distinct patterns of gene amplification identified in GBM tumors from series 1, used for the definition of the 5 different subgroups of GBM based on their gene amplification profiles.

Table 2: Frequency of genetic amplification involving different chromosomal regions in the test (series 1) vs the validation series (series 2-8) of GBM patients analyzed

Number of amplified regions	Chromosomal regions involved	Amplified GBM cases	
		Series 1 n=45/80 (56%)	Series 2-8 n=111/267 (42%)
One chromosomal region amplified (n=100; 29%)	7p	17 (21%)	46(17%)
	12q	3 (4%)	10 (4%)
	4q	4 (5%)	6 (2%)
	1q	2 (3%)	1 (0.4%)
	12p	(0)	2 (0.8%)
	7q	(0)	2 (0.8%)
	13q	(0)	2 (0.8%)
	6p	(0)	1 (0.4%)
	8q	(0)	1 (0.4%)
	15q	(0)	1 (0.4%)
	16q	1(1.2%)	(0)
	17q	(0)	1 (0.4%)
	Subtotal		27 (34%)
Two chromosomal regions amplified (n=39; 11%)	7p,12q	4 (5%)	4 (1%)
	1q,7p	2 (3%)	3 (1%)
	1q,4q	(0)	3 (1%)
	7p,7q	1 (1.2%)	2 (0.8%)
	3q,7p	(0)	2 (0.8%)
	4q,7p	(0)	2 (0.8%)
	4q,12q	2 (3%)	2 (0.8%)
	1q,5p	(0)	1 (0.4%)
	1p7q	1 (1.2%)	(0)
	2q,12q	(0)	1 (0.4%)
	4q,9p	(0)	1 (0.4%)
	5p,7p	(0)	1 (0.4%)
	5q,7p	(0)	1 (0.4%)
	7p,11p	1 (1.2%)	(0)
	7p,9p	(0)	1 (0.4%)
	7p,14q	(0)	1 (0.4%)
	7p, Xp	(0)	1 (0.4%)
	17q,20q	(0)	1 (0.4%)
	20p,20q	(0)	1 (0.4%)
Subtotal		11 (14%)	28 (10%)
≥Three chromosomal regions amplified (n=17; 5%)	1p,1q,10q	(0)	1 (0.4%)
	1p,7p,12q	(0)	1 (0.4%)
	1p,12q,17q	1 (1.2%)	(0)
	1q,7p,12q	1 (1.2%)	(0)
	4p,4q,12p	(0)	1 (0.4%)
	4q,7p,12q	1 (1.2%)	(0)
	4q,7q,12p	(0)	1 (0.4%)
	4q7q12q	1 (1.2%)	(0)
	4q,7p,18q	(0)	1 (0.4%)
	5q,6q,7p	1 (1.2%)	(0)
	6p,7q,12q	(0)	1 (0.4%)
	7p,17p,17q	1 (1.2%)	(0)
	2p,7p,12p,12q	(0)	1 (0.4%)
	4q,7p,7q,15q	(0)	1 (0.4%)
	7p11p11q12q	1 (1.2%)	(0)
	7q,12q,17q,20q	(0)	1 (0.4%)
1p,4p,7p,11q,14q	(0)	1 (0.4%)	
Subtotal		7 (9%)	10 (4%)

Results expressed as number (percentage) of cases showing gene amplification/chromosome arm.

Table 3: Frequency and chromosomal localization of recurrently amplified genes (> 5% of cases) in GBM from series 1 (n=45/80 tumors), and other previously reported series of GBM (n=111/267 tumors) as detected by SNP-arrays

Amplified genes						
Amplified chromosomal regions			Symbol	Frequency of gene amplification		
Chr	Amplified/Total cases (%)	Cytoband		Series 1 (n=45)	Series 2-8 (n=111)	
Chr 7	119/347 (34%)	7p11.2	<i>EGFR</i>	67%	57%	
			<i>LANCL2</i>	40%	19%	
			<i>VSTM2A</i>	31%	29%	
			<i>VOPPI</i>	27%	7%	
			<i>SEC61G</i>	11%	19%	
		12q14.1	<i>CDK4</i>	29%	14%*	
			<i>CYP27B1</i>	29%	2%*	
			<i>METTL1</i>	27%	14%*	
			<i>AVIL</i>	27%	18%*	
			<i>CTDSP2</i>	27%	2%*	
			<i>METT21B</i>	22%	16%*	
			<i>AGAP2</i>	22%	16%*	
			<i>OS9</i>	16%	2%*	
			<i>TSFM</i>	16%	-	
Chr 12	34/347 (10%)	12q13.3	<i>B4GALNT1</i>	16%	14%*	
			<i>KIF5A</i>	11%	10%*	
			<i>PIP4K2C</i>	11%	-	
			<i>SLC26A10</i> [#]	11%	-	
			<i>DTX3</i>	9%	12%*	
			<i>MARS</i>	9%	4%*	
			<i>ARHGEF25</i>	9%	4%*	
			<i>DCTN2</i> [#]	7%	-	
			12q15	<i>ATP23</i>	16%	14%*
				<i>MDM2</i>	9%	12%
<i>CPM</i>	9%	11%				
Chr 4	26/347 (7%)	4q12	<i>SCFD2</i>	18%	7%	
			<i>FIP1L1</i>	18%	14%	
			<i>PDGFRA</i>	18%	10%	
			<i>KIT</i>	7%	10%	
Chr 1	14/347 (4%)	1q32.1	<i>SOX13</i>	11%	5%	
			<i>ETNK2</i>	11%	3%	
			<i>REN</i>	11%	2%	
			<i>KISS1</i>	11%	3%	
			<i>GOLT1A</i>	11%	3%	
			<i>PLEKHA6</i>	11%	5%	
			<i>PIK3C2B</i>	11%	5%	
			<i>MDM4</i>	11%	3%	
			<i>LRRN2</i>	9%	2%	

#genes included in the SNP6 array; *The incidence of amplified genes localized in the 12q14.1, 12q13.3 and 12q15 cytobands was calculated using only the 250k-SNP_Nsp and/or STY arrays (n=50) due to the absence of probes for these specific genes in the 50k array.

Table 4: Overall survival and genetic features of GBM patients from our series (series 1; n=80) and the seven series of GBM patients previously reported in the literature (series 2-8; n=267) and included in this study for a total of 347 GBM investigated

Variables	GBM patient series							
	Series 1 Crespo et al.* (GSE 42631)	Series 2 Chen et al. (GSE 19612)	Series 3 Beroukhim et al. (GSE19399/ GSE9635)	Series 4 Bralten et al. NA	Series 5 Hodgson et al. (GSE 14804)	Series 6 Yin et al. (EMEXP-1330)	Series 7 Kuga et al. (GSE 10922)	Series 8 Solomon et al. (GSE 13021)
Total N. of cases (n=347)	80	24	120	15	12	53	13	30
N. of cases with annotated OS (n=273)	80	24	104	15	NA	50	NA	NA
Median OS months (range)	15 (0-83)	15 (1-31)	18 (1-67)	10 (4-28)	NA	17 (0-90)	NA	NA
N. of SNP probes investigated	5-18x10 ⁵	5x10 ⁵	1-2.5x10 ⁵	2.5x10 ⁵	0.5x10 ⁵	0.5-2.5x10 ⁵	0.5x10 ⁵	2.5x10 ⁵
NO gene AMP (n=191; 55%)	35 (44%)	11 (46%)	75 (62%)	9 (60%)	7 (58%)	31 (58%)	7 (54%)	16 (53%)
Isolated <i>EGFR</i> AMP (n=63; 18%)	17 (21%)	7 (29%)	20 (17%)	1 (7%)	2 (17%)	10 (19%)	2 (15%)	4 (13%)
Isolated non- <i>EGFR</i> AMP (n=37; 11%)	10 (13%)	1 (4%)	11 (9%)	3 (20%)	2 (17%)	7 (13%)	1 (8%)	2 (7%)
New genetical subsets Multiple AMP including <i>EGFR</i> (n=36; 10%)	13 (16%)	3 (13%)	8 (7%)	1 (7%)	0	3 (6%)	2 (15%)	6 (20%)
Multiple AMP without <i>EGFR</i> (n=20; 6%)	5 (6%)	2 (8%)	6 (5%)	1 (7%)	1 (8%)	2 (4%)	1 (8%)	2 (7%)

* 23 additional GBM tumors not available in the GEO data repository were hybridized with the Cytoscan750K (n=11 samples) and Cytoscan HD (n=12 samples) SNP-arrays; AMP: genetic amplification; GAP: genetic amplification profile; GSE: genomic repository series code; OS: overall survival; N: number; NA: not available.

distinct embryonic tissue origins [13, 14]. However, these classification models are difficult to implement in routine diagnostics and/or remain of relatively limited prognostic value [34–36].

Among other cytogenetic/molecular alterations, gene amplification, particularly gene amplification involving the *EGFR* gene, represents one of the most common genetic changes in GBM [11, 20-22, 37]. Thus, *EGFR* amplification at chromosome 7p11.2 can be found in between one third and half of all GBM patients as the only chromosomal region amplified – including a variable number of amplified genes – or it can be found in the same tumor in combination with amplification of genes located at other chromosomal regions, such as the

MDM2, *MDM4*, *PDGFRA* and *CDK4* genes encoded in chromosomes 12q15, 1q32.1, 4q12 and 12q14.1 [11, 14, 38], respectively. Of note, gene amplification is a common genetic alteration across different malignancies and it usually involves (wild-type or mutated) genes that show oncogenic potential (i.e. are capable of reproducing the tumor); thereby, it might confer a malignant phenotype associated with a variable outcome, depending on the specific genes amplified and/or overexpressed. Despite this, no study has been reported so far in which the impact of different GAP on OS has been investigated in a large series of GBM patients.

Here we investigated the GAP across the whole GBM tumor genome and analyzed their impact on

patient OS, based on one of the largest series of GBM patients reported so far in the literature. SNP-arrays were used for both sensitive identification of CNA involving specific DNA sequences across the whole tumor genome

and detailed delineation of the amplified genes; in order to avoid CNV due to germinal single nucleotide polymorphisms, insertions and deletions potentially associated with an increased predisposition to GBM

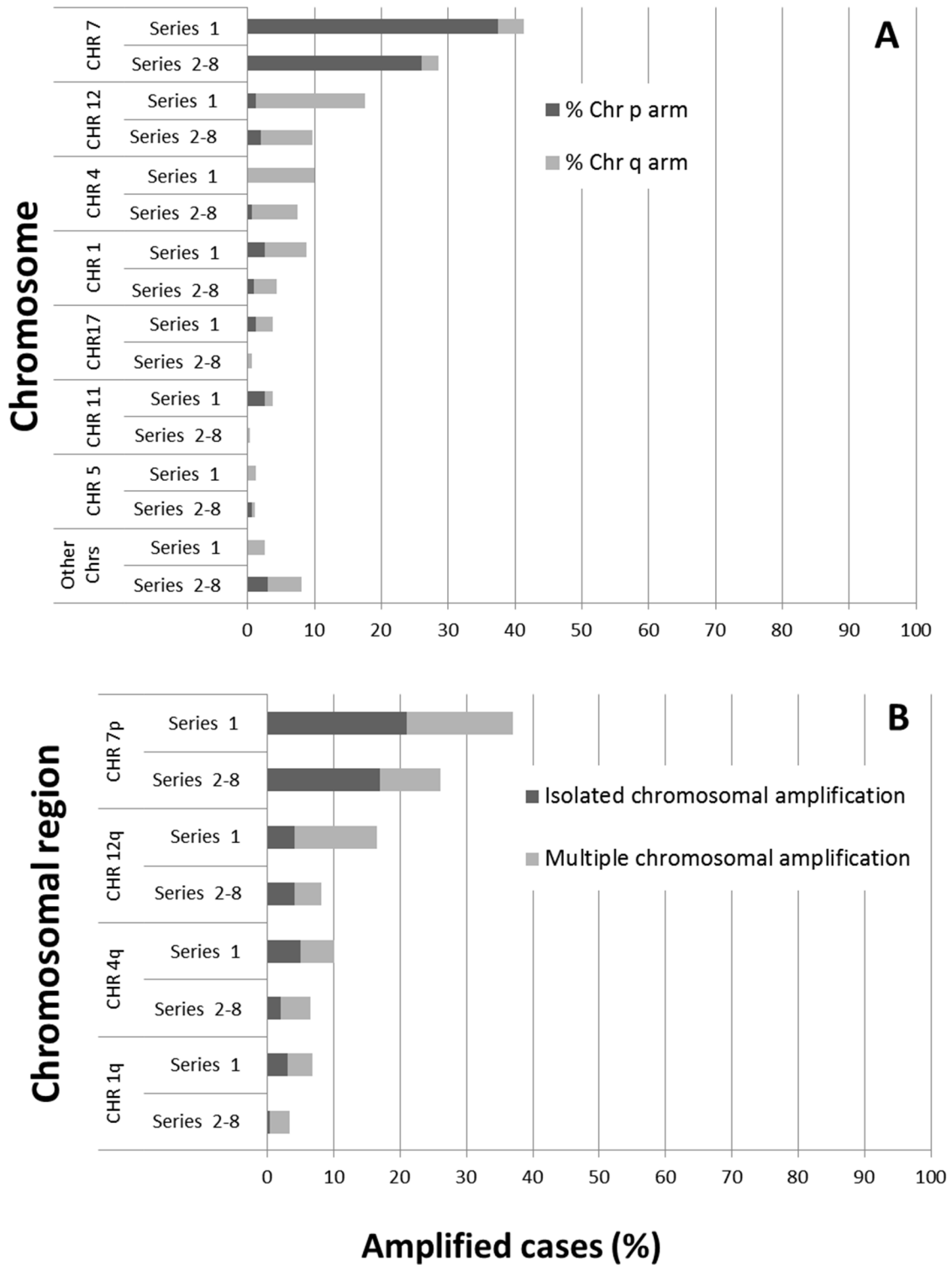


Figure 2: Distribution of the most frequently altered chromosomes (A) and chromosomal regions (B) showing isolated or multiple amplifications both in cases from series 1 (n=45/80) and in patients (111/267) from the seven distinct series previously reported in the literature by others. Results are shown as percentage values from all cases analyzed.

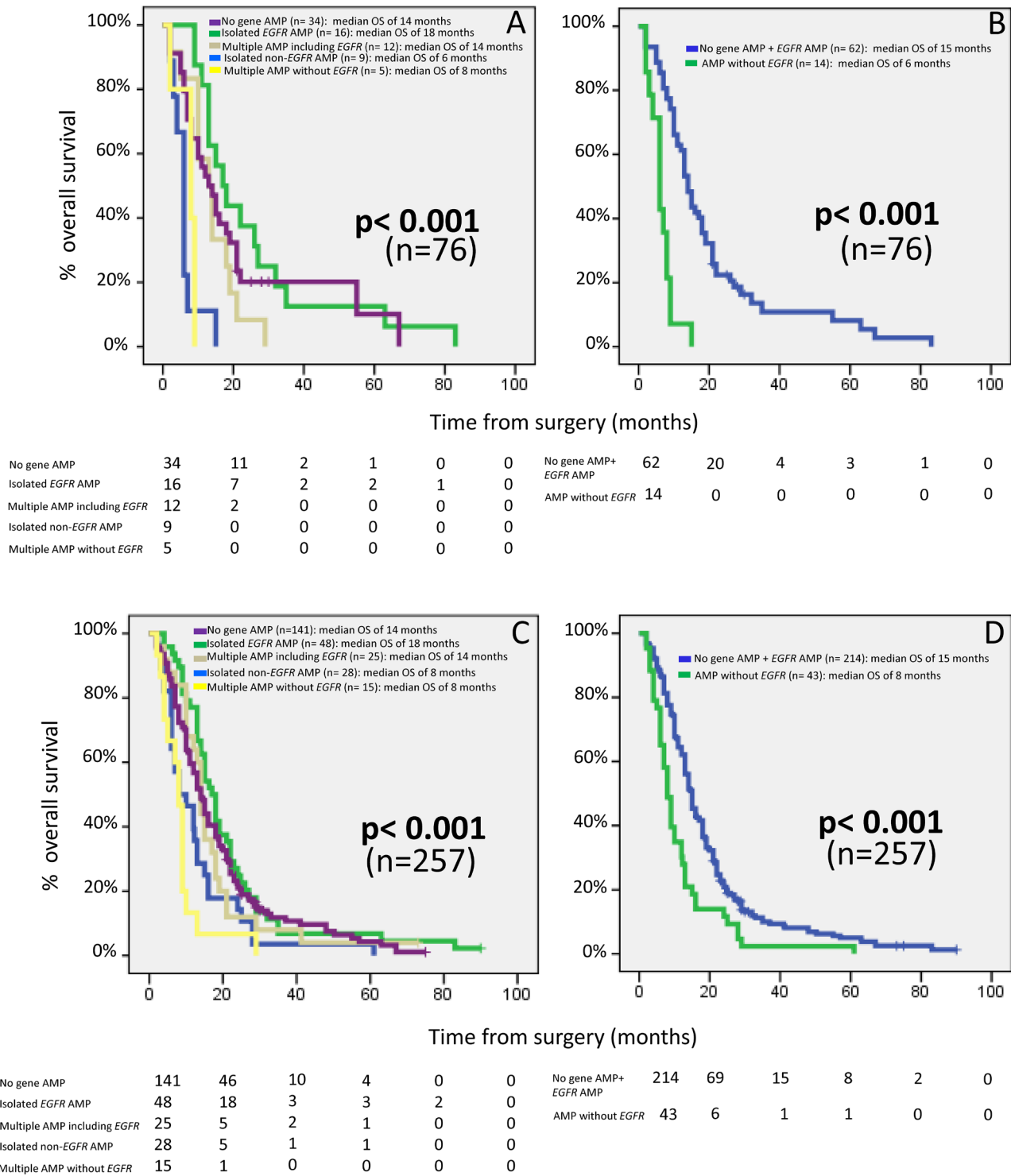


Figure 3: Prognostic impact on overall patient survival of distinct gene amplification profiles of GBM patients from the test cohort – series 1 alone (n=76); **panels (A) and (B)** – and after pooling our cases with 181 additional cases from seven series of GBM patients previously reported in the literature by other groups (**panels (C) and (D)**; n= 257 GBM). In panels (A) and (C), GBM patients were grouped as having i) no gene amplification; ii) isolated *EGFR* amplification; iii) gene amplification at multiple chromosomal regions including *EGFR* gene amplification; iv) isolated amplification of DNA sequences from a single chromosomal region other than 7p11.2 (i.e not including amplification of the *EGFR* gene), and; v) gene amplification at multiple chromosomal regions in the absence of *EGFR* amplification. In panels (B) and (D), patients were grouped as: i) cases showing either no gene amplification or having *EGFR* gene amplification and ii) patients showing genetic amplification at one or more chromosomal regions which did not involve the *EGFR* gene. Median overall survival is expressed in months and was calculated for 257 patients from series 1-8. Cases who were alive but had a follow-up of less than 18 months and/or died within the 1st month after surgery (n= 16) were excluded from OS analyses.

Table 5: Clinical characteristics of the GBM patients included in the series 1 (n=76) and their association to disease outcome

Clinical/genetic characteristics	Patient distribution	Overall survival					
		Univariate analysis		Multivariate analysis			
		Median (range)	<i>p</i> -value	Hazard Ratio (95% CI)	<i>p</i> -value		
Age	>30	2 (2%)	67 (2.7-67)	<.001			
	31-45	9 (12%)	15 (8-21)				
	46-60	21 (28%)	14 (2-63)				
	61-75	34 (45%)	13 (2-83)				
	>75	10 (13%)	6 (2-11)				
Karnofsky Index #	>70	48 (64%)	15 (2-83)	.004			
	≤70	27 (36%)	10 (2-30)				
Type of Surgery	Complete resection	24 (32%)	15 (2-83)	.012			
	Partial resection	41 (54%)	13 (2-67)				
	No resection	11 (14%)	6 (2-21)				
Adjuvant chemotherapy#	Stupp	43 (67%)	18 (2-83)	<.001	3 (2-4)	<.001	
	BCNU	10 (16%)	13 (5-67)				
	No chemotherapy	11 (17%)	6 (2-11)				
Gene amplification profile	No gene AMP	34 (45%)	13 (2-67)	<.001			
	Isolated <i>EGFR</i> AMP	16 (21%)	17 (9-83)				
	Multiple AMP including <i>EGFR</i>	12 (16%)	13 (2-29)				
	Isolated non- <i>EGFR</i> AMP	9 (12%)	6 (2-15)				
	Multiple AMP without <i>EGFR</i>	5 (6%)	8 (2-9)				
	No gene AMP+ <i>EGFR</i> AMP	62 (82%)	14 (2-83)		<.001	6 (2-12)	<.001
	AMP without <i>EGFR</i>	14 (18%)	6 (2-15)				

CI: confidence interval; #: Data of Karnofsky index and adjuvant chemotherapy were only available in only 75 and 65 GBM patients respectively; Stupp: radiotherapy plus temozolamide; BCNU: carmustine; AMP: genetic amplification.

(e.g. the rs1801320 SNP in the RAD51 DNA repair gene [39]), paired tumor and peripheral blood (PB) samples were analyzed per patient.

Overall, our results showed the presence of gene amplification in the majority (>50%) of tumors investigated. As expected, genetic amplification involving DNA sequences at the 7p11.2 chromosomal region was by far the most frequent alteration, followed

by genetic amplification at the 12q, 4q12 and 1q32.1 chromosomal regions, and to a lower extent also, at 1q, 5q, 6q, 7q and at regions in both arms of chromosomes 11 or 17. These results confirm and extend on previous observations by our [20–22] and other groups [40, 41] which indicate that *EGFR* is the most frequently amplified oncogene in GBM, where it is detected in up to 40% of primary GBM tumors in association

with a better outcome, compared to cases that show either no gene amplification or amplification of genes other than *EGFR* [20, 37]. At present, it is well-established that activation of the *EGFR* gene via gene amplification and/or mutations, up-regulates the RAS/RAF/MAPK and PI3K signaling pathways, translating into a tumor phenotype consisting of: i) abnormally high cell proliferation and ii) survival of tumor cells, and iii) an increased angiogenesis [11, 42]. Of note, here we confirm via mapping of the amplified region in chromosome 7p11.2, that this alteration frequently includes also the *LANCL2* gene, in addition to other genes adjacent to the *EGFR* and *LANCL2* genes [20, 43]. Although the *LANCL2* gene codes for a protein involved in up-regulation of AKT and cell survival, and an increased cell sensitivity to adriamycin [44, 45], its precise mechanism of action remains elusive.

In line with previous observations [11, 38, 46], *EGFR* gene amplification at the 7p11.2 chromosomal region, was found either as the only amplified DNA sequence, or in association with amplification of DNA sequences at other chromosomal regions and genes such as the *PDGFRA*, *MDM2*, *MDM4* and *CDK4* genes. Such combined pattern of amplification of multiple genes at distinct chromosomal regions might lead to unique malignant transformation profiles for which the underlying mechanisms are still poorly understood; however, in our series, it did not prove to confer a more adverse outcome vs isolated amp 7p11.2. In contrast, isolated amplification of DNA sequences at chromosomal regions other than that containing the *EGFR* gene, were associated with a significantly shorter OS of GBM patients. Of note, these later alterations most frequently affected genes encoded in the 12q, 4q and 1q chromosomal regions, and they typically involved multiple genes [15]. Thus, amplification of DNA sequences at the 12q13-14 chromosomal region usually included the *CDK4* gene together with the *METTL1*, *CYP27B1*, *AVIL*, *CTDSP2*, *METT21B*, *AGAP2* and *OS9* genes, while genetic amplification at 12q15 affected the *MDM2* oncogene in a significant fraction of all (primary) GBM tumors analyzed. *CDK4* is a member of the Ser/Thr protein kinase family, required for the cell cycle transition from the G1 to S-phase [47]; thus, *CDK4* phosphorylates the *Rb* gene product leading to its inactivation and the release of proteins required for cell cycle progression, at the same time it also down-regulates *TP53* [47]. In turn, *AVIL* binds actin and promotes the development of neuronal cells, while the *MDM2* gene codes for a nuclear-localized E3-ubiquitin ligase whose transcription is recognized as the main p53 negative regulator [48]. In our series, genetic amplification at the 4q11-12 chromosomal region, systematically affected the *PDGFRA* gene together with the *SCFD2* and *FIP1L1* genes. *PDGFRA* [11] codes for a

tyrosine-protein kinase cell surface receptor of the PDGF growth factor, which promotes cell proliferation and migration. Finally, amplification of DNA sequences at chromosome 1q32.1 involved the *MDM4* gene together with the *SOX13*, *ETNK2*, *KISS1*, *GOLT1A*, *PLEKHA6*, *REN* and *PIK3C2B* genes. *MDM4* inhibits *TP53* and *TP73*, mediating cell cycle arrest via binding to their transcriptional activation domain, at the same time it inhibits degradation of *MDM2* [48], whereas *PIK3C2B* belongs to the PI3K gene family and activates signaling for cell proliferation, survival and migration [49]. In turn, the *DTX3* ubiquitin ligase gene probably acts both as a positive and negative regulator of Notch, depending on the developmental stage and cell context [50].

Altogether, these findings indicate that the distinct GAP here reported for GBM tumors might confer a distinct biological and (also) clinical behavior to these tumors. Thus, based on the presence vs absence of gene amplification and its subtypes, five different patterns were defined among our GBM patients, which showed an association with OS. From the prognostic point of view, these five GAP could be further re-grouped into two major risk-groups including: i) patients with either no gene amplification or *EGFR* gene amplification associated with or without amplification of genes coded at chromosomal regions other than chromosome 7p11.2, with a significantly longer OS; and, ii) cases presenting with amplification of one or more chromosomal regions that did not include *EGFR* gene amplification, and that were associated with a significantly poorer outcome. The prognostic impact of this later classification was further confirmed in a larger cohort of GBM patients previously reported in the literature and, together with the type of treatment administered, emerged as the most powerful combination of independent prognostic factor for GBM patients. However, the precise mechanisms involved in determining the distinct survival rates of these two molecular groups of patients, still remain to be elucidated and deserve further investigations.

Despite several classification models have been previously proposed which address the genomic heterogeneity of GBM [13, 14, 27] and identify tumors with different cellular origins, so far they have proven to be of limited prognostic value [34-36, 51] and/or difficult to be used in routine diagnostics due to the complexity of the information they require to classify GBM patients at diagnosis. In contrast, here we propose a relatively simple prognostic stratification model for GBM tumors based on their gene amplification profiles that might be easily implemented in routine laboratory diagnostics, and that will potentially contribute to a better management of the patients. In line with this, we have recently patented an array containing this combination of probes [52] to assess the above referred

Table 6: Clinical and biological characteristics of GBM patients from series 1 who were analyzed by single-nucleotide polymorphism arrays in this study (n=80)

Case ID	Age	Gender	Karnofsky Index (%)	Location	Brain hemisphere	Overall survival or follow-up	Exitus	Treatment	
								Type of surgery	Chemotherapy
GBM1	80	M	ND	Temporal	L	6	Yes	T	ND
GBM2	75	M	80	Fronto-temporal	R	22	Yes	T	Stupp
GBM3	61	F	90	Parietal	R	83	Yes	T	Stupp
GBM4	73	M	100	Temporal	L	19	Yes	P	Stupp
GBM5	38	M	90	Frontal	R	15	Yes	T	Stupp
GBM6	49	F	60	Frontal	R	30*	No	P	Stupp
GBM7	41	M	40	Temporal	R	11	Yes	P	Stupp
GBM8	57	M	90	Tempo-parietal	R	6	Yes	T	Stupp
GBM9	72	M	90	Temporal	R	28	No	P	Stupp
GBM10	62	M	100	Parietal	R	28	No	T	Stupp
GBM11	71	M	80	Temporal	R	27	Yes	P	Stupp
GBM12	50	F	100	Temporal	R	13	Yes	T	Stupp
GBM13	72	F	70	Temporal	R	9	Yes	P	Stupp
GBM14	78	F	100	Frontal	R	6	Yes	T	-
GBM15	61	F	100	Frontal	R	25	No	T	Stupp
GBM16	54	M	100	Fronto-parietal	R	2	Yes	T	Stupp
GBM17	52	M	80	Frontal	R	63	Yes	P	Stupp
GBM18	57	F	90	Temporal	R	10	Yes	P	Stupp
GBM19	68	M	90	Occipital	L	10	Yes	T	Stupp
GBM20	82	F	80	Frontal	L	7	Yes	T	-
GBM21	77	M	70	Temporal	R	6	Yes	P	-
GBM22	69	F	100	Frontal	L	8	Yes	T	Stupp
GBM23	24	F	80	Frontal	L	21	Yes	P	Stupp
G97	53	M	80	Temporal	R	21	Yes	T	Stupp
G94	79	F	80	Temporal	R	9	Yes	P	-
G93	63	M	80	Occipital	R	29	Yes	T	Stupp
G92	54	F	80	Parietal	R	15	Yes	T	Stupp
G91	73	F	60	Occipital	R	13	Yes	P	Stupp
G90	57	F	60	Parietal	L	5	Yes	B	-
G89	51	M	80	Temporal	R	2	Yes	P	-
G88	71	M	80	Parietal	R	8	Yes	P	Stupp
G87	45	M	80	Temporal	L	16	Yes	P	Stupp/ Sequential

(Continued)

Case ID	Age	Gender	Karnofsky Index (%)	Location	Brain hemisphere	Overall survival or follow-up	Exitus	Treatment	
								Type of surgery	Chemotherapy
G83	75	M	70	Temporal	R	10	Yes	P	-
G82	78	M	70	Frontal	R	2	Yes	B	-
G81	62	F	70	Frontal	R	13	Yes	P	Stupp
G80	43	M	80	Frontal	R	18	Yes	T	Stupp
G79	71	F	60	Occipital	R	6	Yes	B	-
G73	78	F	60	Parietal	L	4	Yes	B	-
G72	77	F	70	Temporal	L	1	Yes	P	-
G71	66	F	60	Parietal	R	10	Yes	P	Sequential
G70	56	F	80	Occipital	L	21	Yes	P	Stupp
G68	72	M	70	Insular	L	26	Yes	T	Stupp
G67	68	F	80	Parietal	R	35	Yes	P	Stupp
G66	60	M	80	Occipital	R	14	Yes	T	Stupp
G65	69	F	60	Parietal	L	1	Yes	P	-
G64	57	M	60	Occipital	L	8	Yes	P	Sequential
G63	61	F	60	Insular	R	13	Yes	P	Sequential
G62	57	F	90	Occipital	R	18	Yes	T	Stupp
G57	34	M	90	Frontal	R	8	Yes	T	Stupp
G56	65	M	80	Frontal	L	13	Yes	P	Stupp
G55	54	F	80	Frontal	R	17	Yes	P	Stupp
G54	65	F	60	Parietal	L	6	Yes	P	-
G53	74	M	60	Frontal	L	29	Yes	T	Stupp
G52	56	M	90	Frontal	L	21	Yes	B	Stupp
G51	60	M	60	Temporal	R	2	Yes	B	-
G50	84	M	70	Temporal	R	11	Yes	P	-
G46	62	M	60	Frontal	L	3	Yes	P	-
G45	76	F	60	Temporal	R	10	Yes	P	-
G44	48	M	80	Frontal	L	22	Yes	P	PCV
G43	67	F	70	Temporal	R	7	Yes	P	-
G42	67	M	80	Temporal	R	2	Yes	P	-
G41	44	F	60	Frontal	R	14	Yes	B	Sequential
G40	45	F	80	Frontal	R	15	Yes	P	BCNU+TMZ
G39	70	F	50	Frontal	R	18	Yes	P	Stupp
G37	70	M	80	Temporal	R	32	Yes	T	Stupp
G35	50	F	80	Frontal	L	2	Yes	P	-
G34	69	M	60	Temporal	R	5	Yes	B	-
G31	71	F	90	Frontal	R	7	Yes	P	-

(Continued)

Case ID	Age	Gender	Karnofsky Index (%)	Location	Brain hemisphere	Overall survival or follow-up	Exitus	Treatment	
								Type of surgery	Chemotherapy
G30	71	F	70	Temporal	R	9	Yes	B	-
G29	49	F	80	Parietal	L	12	Yes	B	Sequential
G25	68	M	80	Frontal	L	6	Yes	P	Stupp
G23	50	F	70	Frontal	R	14	Yes	B	Stupp
G17	30	F	90	Temporal	R	67	Yes	P	Sequential
G15	79	M	80	Parietal	L	5	Yes	T	Sequential
G14	69	F	70	Frontal	R	0	Yes	B	-
G13	39	F	90	Frontal	R	20	Yes	P	Sequential
G12	74	M	70	Temporal	R	1	Yes	B	-
G10	35	F	80	Temporal	L	15	Yes	P	Stupp
G8	67	F	90	Deep	NA	9	Yes	P	Stupp
G6	70	F	80	Temporal	R	19	Yes	P	Stupp

GAP, and that we hope can be commercially available for routine diagnostics soon.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

Overall, 347 GBM tumors were studied. These included two groups of adult patients: the first group consisted of 80 caucasian GBM patients (group 1, series 1) with histological diagnosis of primary GBM based on the WHO criteria (38 males and 42 females; mean age of 62±13 years, ranging from 24 to 84 years) (Table 6). Fifty-seven of these 80 patients (71%) were admitted to the University Hospital of Coimbra (Coimbra, Portugal) and their genomic data has been deposited in the genomic repository GEO (series code number: GSE42631) and 23 (29%) were from the University Hospital of Salamanca (Spain). Each patient from series 1 gave his/her informed consent prior to entering the study, and the study was approved by the local Ethics Committees of both institutions, according to the Declaration of Helsinki. For each patient within this first group, tumor samples containing representative areas of (fresh) tumor tissues were obtained by surgical resection, immediately (<30 min) snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for further SNP-array studies; in parallel, a PB sample was also collected from each patient. Prior to the SNP-array studies, a section was cut from the stored tissue blocks and assessed by conventional histopathological procedures for its tumoral cell contents. Specimens with ≥75% tumoral

cells, in the absence of significant contamination by normal brain parenchyma and tumoral necrosis, were selected for further DNA and RNA extraction.

The second group of GBM patients included 267 unselected cases from 7 different series of GBM (series 2 to 8; group 2) previously reported in the literature [15, 24, 28–32]. Data from cases included in one of these series (series 4; n=15 cases) were kindly provided by Bralten et al [32], while data about the patients and tumor samples from the other six series was accessed from publicly available data bases – GSE19612 (series 2; 24 cases); GSE19399 and GSE9635 (series 3; 104 and 16 cases, respectively); GSE14804 (series 5; 12 cases); E-MEXP1330 (series 6, 53 cases); GSE10922 (series 7; 13 cases) and GSE13021 (series 8; 30 cases)–.

DNA extraction and identification of copy number alterations by SNP-arrays

DNA from frozen tumor samples (n=80 tumors from series 1) was purified using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the instructions of the manufacturer. The yield and purity of the extracted DNA were determined using a NanoDrop-1000 spectrophotometer (Nano-Drop Technologies Inc, Wilmington, DE, USA), and they systematically showed absorbance (A) values >1.5 at 260/230nm and ≥1.8 at 260/280nm wavelengths, respectively. DNA integrity was evaluated by conventional electrophoretic procedures in a 1% agarose gel. RNA extraction and cDNA synthesis were performed

following the standard operating procedures (SOPs) of the Spanish DNA Bank Carlos III (University of Salamanca, Salamanca, Spain) (<http://www.bancoadn.org>).

For the investigation of CNAs by SNP-arrays, DNA from frozen tumor tissues and their paired PB samples was used in order to exclude individual CNV due to germline SNPs, small insertions and deletions. Briefly, extracted DNA (250ng per array) was digested with restriction enzymes and ligated to the corresponding adaptors, following conventional Affymetrix procedures (Affymetrix Inc, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A generic primer that recognizes the adaptor sequence was used in triplicate, to amplify adaptor-ligated DNA fragments via polymerase chain reaction (PCR). The amplified DNA was then fragmented, labeled, and hybridized to the corresponding SNP-array (please see below). After hybridization, chips were washed in an Affymetrix Fluidics Station 450 (Affymetrix) and the hybridized sequences were labeled using streptavidin-phycoerythrin, and assayed by fluorescence detection using a GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). The allelotype at a locus was then determined based on probe-associated fluorescence intensity data for oligonucleotides complementary to the reference sequences that covered the corresponding SNP position.

In the test series (series 1), 4 different types of SNP-arrays were used. These included: i) the GeneChip Human Mapping 500K Array Set (n=35 tumors), which provides information about >500,000 SNPs according to the NCBI/hg19 assembly (262,264 SNPs in the Nsp array and 238,304 SNPs in the Sty array); ii) the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (n=22 cases), which contains probes for 906,600 SNPs and 945,826 non-polymorphic probes featuring a total of >1.8 million probes (Affymetrix); and, iii) the CytoScan 750K and Cytoscan HD arrays (n=23 tumors) which contain probes for 200,436 SNPs and 743,304 non-polymorphic probes (Affymetrix). Data about DNA probes was analyzed with the Console Genotyping software (version 3.0.2; Affymetrix). In addition, the dChip 2010 software (<http://www.dchip.org>; Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA) was used to calculate CNA values. To plot CNAs according to their chromosomal location, the Chromosome Analysis Suite (CHAS) was used. The Hg 19 human genome sequence was used as reference to name the amplified genes, as defined by CNAs values > 4.8 (arbitrary units) typically corresponding to > 7 DNA copies (in order to exclude polyploidies) [29].

For the validation series, data on 7 different SNP-array chips (Affymetrix 50K, 100K, 250K and/or 500K SNP-arrays) previously reported by others [15, 23, 24, 28–32] were used for the analysis of CNA. The number of common SNPs for the 100K and 500k arrays, and for the 500K and cytoscan HD arrays, was of 21,144 and 65,535 SNPs, respectively, for a total of around 11,000 SNPs in common to all SNPs-arrays used.

Mutational analyses

Analysis of *IDH1* and *IDH2* gene mutations was based on DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues (n=54) using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Germany) according to the instructions of the manufacture. Exon 4 DNA of both the *IDH1* and the *IDH2* genes was amplified by PCR and sequenced on a capillary automated sequencer (CEQ 8000; Beckman-Coulter, Hialeah, FL, USA); mutational analysis of the sequence data was performed using the Sequencher, (version 4.7) software (Genes Codes, Ann Arbor, MI, USA). None of the 54 primary GBM cases analyzed showed *IDH1* or *IDH2* mutations.

Statistical analysis

The statistical significance of differences observed between groups was assessed by the Student T and the Mann-Whitney U tests, for parametric and non-parametric (continuous) variables, respectively; for categorical variables, the X^2 test was used. Overall, 257 GBM who survived for >1 month after surgery and had a minimum follow-up of 18 months (for patients remaining alive) were included in OS analyses. Survival curves were plotted according to the method of Kaplan and Meier, and the (two-sided) log-rank test was used to assess the statistical significance of differences in OS among distinct groups of patients. Multivariate analysis of prognostic factors for OS was performed using the Cox stepwise regression model. In this part of the study, only those variables showing a significant association with RFS in the univariate analysis were included (Table 5). *P*-values <0.05 were considered to be associated with statistical significance. For all statistical analysis, the SPSS software (SPSS 17.0, IBM SPSS, Armonk, NY, USA), was used.

Author contributions

Specific contributions of each author are: Álvaro Otero, Pablo Sousa, Hermínio Tão, Olinda Rebelo, Marcos Barbosa and Pim J French have provided samples and clinical or histopathological data; María González-Tablas, Inês Crespo, Ana Luísa Vital and María Dolores Tabernero have processed the samples; Luis Antonio Corchete, Ana Belen Nieto and María Carmen Patino-Alonso have analyzed SNP-data; María Dolores Tabernero, Alberto Orfao, Maria Celeste Lopes and María González-Tablas have design the study, drafted and writing the manuscript. Maria Rosario Almeida and Ana Filipa Guedes analyzed the *IDH1* and *IDH2* mutational status. All authors have contributed significantly to this article and all of them have read and approved the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declared that they have no conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by RETICC RD06/0020/0035, RD06/0020/0059 and RD12/0036/0048 grants from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, (Madrid, Spain and FONDOS FEDER), AES PI16/000476 (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain and FONDOS FEDER), GRS909A14 (JCYL) and CB16/12/00400 grant (CIBER-ONC, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain and FONDOS FEDER).

REFERENCES

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131:803-20.
2. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia.* 2012; 60:502-14.
3. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Tavaré S. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110:4009-14.
4. Lee CY. Strategies of temozolomide in future glioblastoma treatment. *Onco Targets Ther.* 2017; 10:265-70.
5. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60:166-93.
6. Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer.* 2010; 9:135.
7. Gravendeel LA, Kouwenhoven MC, Gevaert O, de Rooi JJ, Stubbs AP, Duijm JE, Daemen A, Bleeker FE, Bralten LB, Kloosterhof NK, De Moor B, Eilers PH, van der Spek PJ, et al. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res.* 2009; 69:9065-72.
8. Cloughesy TF, Mischel PS. New strategies in the molecular targeting of glioblastoma: how do you hit a moving target? *Clin Cancer Res.* 2011; 17:6-11.
9. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015; 129:829-48. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1>.
10. Virk SM, Gibson RM, Quinones-Mateu ME, Barnholtz-Sloan JS. Identification of variants in primary and recurrent glioblastoma using a cancer-specific gene panel and whole exome sequencing. *PLoS One.* 2015; 10:e0124178.
11. Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, Ozawa T, Holland EC, Huse JT, Jhanwar S, Leversha MA, Mikkelsen T, Brennan CW. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:3041-6.
12. The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008; 455:1061-8.
13. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrester WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, 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.
14. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, 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.
15. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Tunici P, Finocchiaro G, Eoli M, Ruckert C, Huynh T, Liu G, Kato M, Sanada M, Jauch A, Dugas M, et al. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol Cancer Res.* 2009; 7:665-77.
16. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshahr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhim R, Bernard B, Wu CJ, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell.* 2013; 155:462-77.
17. Ichimura K, Pearson DM, Kocalkowski S, Backlund LM, Chan R, Jones DT, Collins VP. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2009; 11:341-7.
18. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia.* 2010; 12:675-84.
19. Rong Y, Belozero V, Tucker-Burden C, Chen G, Durden DL, Olson JJ, Van Meir EG, Mackman N, Brat DJ. Epidermal growth factor receptor and PTEN modulate tissue factor expression in glioblastoma through JunD/activator protein-1 transcriptional activity. *Cancer Res.* 2009; 69:2540-9.

20. Crespo I, Tao H, Nieto AB, Rebelo O, Domingues P, Vital AL, Patino Mdel C, Barbosa M, Lopes MC, Oliveira CR, Orfao A, Tabertero MD. Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: impact on gene expression levels. *PLoS One*. 2012; 7:e46088.
21. Crespo I, Vital AL, Nieto AB, Rebelo O, Tao H, Lopes MC, Oliveira CR, French PJ, Orfao A, Tabertero MD. Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. *J Mol Diagn*. 2011; 13:634-47.
22. Vital AL, Tabertero MD, Crespo I, Rebelo O, Tao H, Gomes F, Lopes MC, Orfao A. Intratumoral patterns of clonal evolution in gliomas. *Neurogenetics*. 2010; 11:227-39.
23. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT, Pinchback RM, Ligon AH, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010; 463:899-905.
24. Hodgson JG, Yeh RF, Ray A, Wang NJ, Smirnov I, Yu M, Hariono S, Silber J, Feiler HS, Gray JW, Spellman PT, Vandenberg SR, Berger MS, et al. Comparative analyses of gene copy number and mRNA expression in glioblastoma multiforme tumors and xenografts. *Neuro Oncol*. 2009; 11:477-87.
25. Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahloun AG, Meltzer PS, Collins VP. Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res*. 1996; 56:5141-5.
26. Riemenschneider MJ, Knobbe CB, Reifenberger G. Refined mapping of 1q32 amplicons in malignant gliomas confirms MDM4 as the main amplification target. *Int J Cancer*. 2003; 104:752-7.
27. Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, et al. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res*. 2003; 63:1602-7.
28. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2010; 17:362-75.
29. Beroukhi R, Getz G, Nghiemphu L, Barretina J, Hsueh T, Linhart D, Vivanco I, Lee JC, Huang JH, Alexander S, Du J, Kau T, Thomas RK, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:20007-12.
30. Kuga D, Mizoguchi M, Guan Y, Hata N, Yoshimoto K, Shono T, Suzuki SO, Kukita Y, Tahira T, Nagata S, Sasaki T, Hayashi K. Prevalence of copy-number neutral LOH in glioblastomas revealed by genomewide analysis of laser-microdissected tissues. *Neuro Oncol*. 2008; 10:995-1003.
31. Solomon DA, Kim JS, Cronin JC, Sibenaller Z, Ryken T, Rosenberg SA, Ransom H, Jean W, Bigner D, Yan H, Samuels Y, Waldman T. Mutational inactivation of PTPRD in glioblastoma multiforme and malignant melanoma. *Cancer Res*. 2008; 68:10300-6.
32. Bralten LB, Kloosterhof NK, Gravendeel LA, Sacchetti A, Duijm EJ, Kros JM, van den Bent MJ, Hoogenraad CC, Sillevius Smitt PA, French PJ. Integrated genomic profiling identifies candidate genes implicated in glioma-genesis and a novel LEO1-SLC12A1 fusion gene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010; 49:509-17.
33. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet*. 2015; 16:172-83.
34. Lin N, Yan W, Gao K, Wang Y, Zhang J, You Y. Prevalence and clinicopathologic characteristics of the molecular subtypes in malignant glioma: a multi-institutional analysis of 941 cases. *PLoS One*. 2014; 9:e94871.
35. Yan W, Zhang W, You G, Zhang J, Han L, Bao Z, Wang Y, Liu Y, Jiang C, Kang C, You Y, Jiang T. Molecular classification of gliomas based on whole genome gene expression: a systematic report of 225 samples from the Chinese Glioma Cooperative Group. *Neuro Oncol*. 2012; 14:1432-40.
36. Crisman TJ, Zelaya I, Laks DR, Zhao Y, Kawaguchi R, Gao F, Kornblum HI, Coppola G. Identification of an Efficient Gene Expression Panel for Glioblastoma Classification. *PLoS One*. 2016; 11:e0164649.
37. Hobbs J, Nikiforova MN, Fardo DW, Bortoluzzi S, Cieply K, Hamilton RL, Horbinski C. Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36:1186-93.
38. Furgason JM, Koncar RF, Michelhaugh SK, Sarkar FH, Mittal S, Sloan AE, Barnholtz-Sloan JS, Bahassi el M. Whole genome sequence analysis links chromothripsis to EGFR, MDM2, MDM4, and CDK4 amplification in glioblastoma. *Oncoscience*. 2015; 2:618-28. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.178>.
39. Franceschi S, Tomei S, Mazzanti CM, Lessi F, Aretini P, La Ferla M, De Gregorio V, Pasqualetti F, Zavaglia K, Bevilacqua G, Naccarato AG. Association between RAD 51 rs1801320 and susceptibility to glioblastoma. *J Neurooncol*. 2016; 126:265-70.
40. Jeuken J, Sijben A, Alenda C, Rijntjes J, Dekkers M, Boots-Sprenger S, McLendon R, Wesseling P. Robust detection of EGFR copy number changes and EGFR variant III: technical aspects and relevance for glioma diagnostics. *Brain Pathol*. 2009; 19:661-71.
41. Srividya MR, Thota B, Arivazhagan A, Thennarasu K, Balasubramanian A, Chandramouli BA, Hegde AS, Santosh V. Age-dependent prognostic effects of EGFR/p53 alterations in glioblastoma: study on a prospective cohort

- of 140 uniformly treated adult patients. *J Clin Pathol*. 2010; 63:687-91.
42. Turner KM, Sun Y, Ji P, Granberg KJ, Bernard B, Hu L, Cogdell DE, Zhou X, Yli-Harja O, Nykter M, Shmulevich I, Yung WK, Fuller GN, et al. Genomically amplified Akt3 activates DNA repair pathway and promotes glioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:3421-6.
 43. Eley GD, Reiter JL, Pandita A, Park S, Jenkins RB, Maihle NJ, James CD. A chromosomal region 7p11.2 transcript map: its development and application to the study of EGFR amplicons in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2002; 4:86-94.
 44. Zeng M, van der Donk WA, Chen JR. Lanthionine synthetase C-like protein 2 (LanCL2) is a novel regulator of Akt. *Mol Biol Cell*. 2014; 25:3954-61.
 45. Landlinger C, Salzer U, Prohaska R. Myristoylation of human LanC-like protein 2 (LANCL2) is essential for the interaction with the plasma membrane and the increase in cellular sensitivity to adriamycin. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1758:1759-67.
 46. Chakravarty D, Pedraza AM, Cotari J, Liu AH, Punko D, Kokroo A, Huse JT, Altan-Bonnet G, Brennan CW. EGFR and PDGFRA co-expression and heterodimerization in glioblastoma tumor sphere lines. *Sci Rep*. 2017; 7:9043.
 47. Brookes S, Gargica S, Sanij E, Rowe J, Gregory FJ, Hara E, Peters G. Evidence for a CDK4-dependent checkpoint in a conditional model of cellular senescence. *Cell Cycle*. 2015; 14:1164-73.
 48. Pei D, Zhang Y, Zheng J. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx. *Oncotarget*. 2012; 3:228-35. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.443>.
 49. Katso RM, Pardo OE, Palamidessi A, Franz CM, Marinov M, De Laurentiis A, Downward J, Scita G, Ridley AJ, Waterfield MD, Arcaro A. Phosphoinositide 3-Kinase C2beta regulates cytoskeletal organization and cell migration via Rac-dependent mechanisms. *Mol Biol Cell*. 2006; 17:3729-44.
 50. Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, Yan H, Adamson C. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol*. 2009; 3:39-52.
 51. Le Mercier M, Hastir D, Moles Lopez X, De Nève N, Maris C, Trepant AL, Rorive S, Decaestecker C, Salmon I. A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One*. 2012; 7:e45475.
 52. Taberero MD. A method for the global detection of chromosomal gains and losses, and an array for assessing genetic abnormalities. Spanish patent n° 2012318929 and European Trade Mark Register "FullChromArray" n° 11057627 and United States TM number 85826459. 2012 Nov 27.

Artículo 2: “Los perfiles de expresión de los genes *EGFR*, *CDK4*, *MDM4* y *PDGFRA* son heterogéneos y no se asocian con la supervivencia de pacientes con GB primarios”

María González-Tablas^{1,2}, Daniel Arandia^{1,3}, María Jara-Acevedo^{1,4,5}, Álvaro Otero^{1,3}, Ana-Luisa Vital⁶, Carlos Prieto^{1,7}, Nerea González-García^{1,8}, Ana Belén Nieto-Librero^{1,8}, Herminio Tao⁹, Daniel Pascual^{1,3}, Laura Ruiz^{1,3}, Pablo Sousa^{1,3}, Purificación Galindo-Villardón⁸, Alberto Orfao^{1,2,4,*} y María Dolores Taberero^{1,2,4,10,*}

¹ Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, IBSAL—Hospital Universitario de Salamanca, España; ² Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL-IBSAL), Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España; ³ Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario, España; ⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto Carlos III, Madrid, España; ⁵ Servicio de secuenciación de ADN, (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España; ⁶ Centro de Neurociencias y Biología celular, Universidad de Coimbra, Portugal; ⁷ Servicio de Bioinformática (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España; ⁸ Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca, Salamanca, España; ⁹ Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario de Coimbra, Portugal; ¹⁰ Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL-IBSAL), Salamanca, España

*Ambos autores han contribuido de manera equitativa en este trabajo y deben ser considerados como último autor.

Cancers, 2020

DOI: [10.3390/cancers12010231](https://doi.org/10.3390/cancers12010231)

Introducción. El impacto pronóstico del perfil de expresión de los genes (GEP) *EGFR*, *CDK4*, *MDM4* o *PDGFRA* amplificados de forma recurrente en el GB, sigue siendo controvertido.

Objetivo: En este trabajo hemos analizado la relación existente entre el GEP de los genes frecuentemente amplificados en GB y las alteraciones correspondientes en el número de copias de estos genes, incluidas las deleciones intragénicas en los genes *EGFR* y *PDGFRA*, con el fin de poder determinar, en una segunda fase, el posible impacto de dichos GEP y de las alteraciones en el número de copias (CNA) en la supervivencia de pacientes con GB.

Material y métodos. Para alcanzar nuestro objetivo, investigamos el perfil de expresión génica, a nivel de ARNm, del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4), el doble minuto 4 murino (MDM4) y el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA), en 83 GB y 42 muestras de tejido cerebral normal. El análisis de los GEP de estos cuatro genes se correlaciona con las CNA de los mismos, detectadas mediante hibridación *in situ* fluorescente sobre núcleos interfásicos (iFISH), junto con el análisis de las deleciones intragénicas existentes a nivel de ADN en *EGFR* y *PDGFRA*, mediante técnica de PCR. Como cohorte de validación, incluimos en el estudio los GEP de 293 muestras incluidas en 10 series de pacientes diagnosticados de GB, disponibles en repositorios públicos.








Resultados. En términos globales, *EGFR* fue el gen que encontramos amplificado con mayor frecuencia (36%) en nuestros pacientes, seguido de los genes *CDK4* (18%), *MDM4* (9%) y *PDGFRA* (7%). Por el contrario, a nivel de ARN, CDK4 fue el gen que encontramos sobreexpresado con mayor frecuencia (90%), seguido de EGFR (58%) y PDGFRA (58%).

Desde el punto de vista funcional observamos una asociación muy significativa entre la existencia de amplificación del gen *EGFR* y el nivel de expresión de ARNm de este gen ($p < 0,001$). En contraposición, las alteraciones en el número de copias del cromosoma 7, incluyendo las trisomías (49%) y las polisomías (44%) de este cromosoma, no mostraron una asociación significativa con los niveles de expresión del gen *EGFR*. En conjunto, encontramos deleciones intragénicas de *EGFR* en 39 pacientes (47%), incluyendo la variante *EGFRvIII* (46%) como única variante (40%), o en asociación con *EGFRvIVa* (2%), *EGFRvII* (2%) u otras deleciones de *EGFR* (3%), mientras que la deleción de los exones 8 al 9 de *PDGFRA* se encontró en sólo dos tumores (2%). Las deleciones intragénicas de *EGFR* (con o sin amplificación del gen) no muestran un impacto significativo en la supervivencia general de los pacientes con GB. Los perfiles de expresión de los genes amplificados de forma recurrente en GB no mostraron un impacto en la supervivencia de los pacientes ($p > 0.05$).

Conclusiones: A nivel de expresión, los genes *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, y *PDGFRA* muestran un perfil heterogéneo relacionado, solo en parte, con la presencia de amplificación de los mismos a nivel de ADN, el aumento del número de copias del cromosoma en el que se localizan y/o la presencia de variantes con deleciones intragénicas, lo que pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos subyacentes a la expresión de los genes alterados a nivel de ADN en GB sin un impacto pronóstico claro.

Article

Heterogeneous *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* Gene Expression Profiles in Primary GBM: No Association with Patient Survival

María González-Tablas ^{1,2} , Daniel Arandia ^{1,3}, María Jara-Acevedo ^{1,4,5}, Álvaro Otero ^{1,3} , Ana-Luisa Vital ⁶, Carlos Prieto ^{1,7}, Nerea González-García ^{1,8} , Ana Belén Nieto-Librero ^{1,8} , Herminio Tao ⁹, Daniel Pascual ^{1,3}, Laura Ruiz ^{1,3}, Pablo Sousa ^{1,3}, Purificación Galindo-Villardón ⁸ , Alberto Orfao ^{1,2,4,*,†}  and María Dolores Taberero ^{1,2,4,10,*,†} 

- ¹ Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, IBSAL—University Hospital of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; mtablaspi@usal.es (M.G.-T.); Dan_imed@hotmail.com (D.A.); mariajara@usal.es (M.J.-A.); aoteror@usal.es (Á.O.); cprietos@usal.es (C.P.); nerea_gonzalez_garcia@usal.es (N.G.-G.); ananieto@usal.es (A.B.N.-L.); truehawkmoon@yahoo.es (D.P.); lauraruzmartin22@gmail.com (L.R.); pasoucas@yahoo.es (P.S.)
- ² Centre for Cancer Research (CIC-IBMCC, CSIC/USAL, IBSAL) and Department of Medicine, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
- ³ Neurosurgery Service of the University Hospital of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
- ⁴ Biomedical Research Networking Centre on Cancer—CIBER-CIBERONC, Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- ⁵ Sequencing DNA Service (NUCLEUS), University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
- ⁶ Centre for Neuroscience and Cell Biology and Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, 3004-561 Coimbra, Portugal; anavitalcast@gmail.com
- ⁷ Bioinformatics Service (NUCLEUS), University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
- ⁸ Department of Statistics, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; pgalindo@usal.es
- ⁹ Neurosurgery Service, University Hospital of Coimbra, 3004-561 Coimbra, Portugal; herminiotao@gmail.com
- ¹⁰ Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL-IBSAL), 37007 Salamanca, Spain
- * Correspondence: orfao@usal.es (A.O.); taberner@usal.es (M.D.T.); Tel.: +34923-29-11-00 (M.D.T.)
- † Both authors have equally contributed to this work and should be considered as last authors.

Received: 17 December 2019; Accepted: 14 January 2020; Published: 17 January 2020



Abstract: Background: The prognostic impact of the expression profile of genes recurrently amplified in glioblastoma multiforme (GBM) remains controversial. Methods: We investigated the RNA gene expression profile of epidermal growth factor receptor (*EGFR*), cyclin-dependent kinase 4 (*CDK4*), murine double minute 4 (*MDM4*), and platelet derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*) in 83 primary GBM tumors vs. 42 normal brain tissue samples. Interphase FISH (iFISH) analysis for the four genes, together with analysis of intragenic deletions in *EGFR* and *PDGFRA*, were evaluated in parallel at the DNA level. As validation cohort, publicly available RNA gene expression data on 293 samples from 10 different GBM patient series were also studied. Results: At the RNA level, *CDK4* was the most frequently overexpressed gene (90%) followed by *EGFR* (58%) and *PDGFRA* (58%). Chromosome 7 copy number alterations, i.e., trisomy (49%) and polysomy (44%), showed no clear association with *EGFR* gene expression levels. In turn, intragenic *EGFR* deletions were found in 39 patients (47%), including *EGFRvIII* (46%) in association with *EGFRvIVa* (4%), *EGFRvII* (2%) or other *EGFR* deletions (3%) and *PDGFRA* deletion of exons 8–9 was found in only two tumors (2%). Conclusions: Overall, none of the gene expression profiles and/or intragenic *EGFR* deletions showed a significant impact on overall survival of GBM supporting the notion that other still unraveled features of the disease might play a more relevant prognostic role in GBM.

Keywords: glioblastoma; gene expression profile; amplification; intragenic deletions; heterogeneity

1. Introduction

In the last decade multiple genetic alterations have been reported in primary glioblastoma (GBM) [1]. Among those alterations for which a pathogenic and clinical relevance have been recurrently suggested, amplification (i.e., at the DNA level) and/or overexpression (i.e., at the RNA level) of the epidermal growth factor receptor (*EGFR*), cyclin dependent kinase 4 (*CDK4*), mouse double minute 4 (*MDM4*), and platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*) genes, are included [2,3]. Thus, gene amplification, and particularly *EGFR* gene amplification, is currently considered a major driver of tumor progression with potential prognostic value for risk stratification of GBM [4].

Interestingly, gene amplification has also been associated with copy number alterations (CNA), point mutations, and intragenic deletions of these same four genes. Of note, the intragenic deletions affecting some exons of a gene like the *EGFR* gene, might affect the functional domains of the gene with or without an increase on its expression at the RNA level. An example is the association observed between *EGFR* gene amplification and intragenic deletion of exons 2–7 of *EGFR* (i.e., *EGFRvIII*), a mutant with potential for targeted therapies. However, the prognostic significance of *EGFR* gene amplification and *EGFRvIII* gene deletion remains controversial [5,6]. In addition to *EGFRvIII*, several other *EGFR* intragenic deletions have been identified which involve different domains of the *EGFR* protein. These include (i) *EGFRvI*, consisting of an exon 1–13 deletion [7]; (ii) *EGFRvII*, an exon 14–15 deletion [8]; (iii) *EGFR vIV* and *EGFR vIVa* [9], both associated with deletion of exons 25–27; (iv) *EGFR vIVb*, consisting of an exon 25–26 deletion [10]; (v) *EGFRvV*, defined by deletion of exons 25–28 [9], and deletions of (vi) exons 2–5 [10]; (vii) exons 12–13 [11]; (viii) exon 4 [12]; (ix) exon 27, and (x) exons 27–28 [13]. In a subset of tumors, two or more of these later *EGFR* deletions coexist and/or are associated with *EGFR* gene amplification [14].

Similar to the *EGFR* gene, the *PDGFRA* gene encoded at chromosome 4q12, is also altered in a subset of GBM tumors that present *PDGFRA* amplification in association with intragenic deletions of exons 8–9 [15]. Other amplified genes in GBM include the *CDK4* and *MDM4* genes encoded at chromosomes 12q14.1 and 1q32.1, respectively [16]. Amplification of these two later genes might be found in association or not with amplification of the *EGFR* gene [4,11]. Altogether, these findings indicate that several gene amplification profiles are present in GBM [4,17], suggesting that gene amplification might play a relevant role in these tumors. Despite the potential impact of gene amplification on the levels of expression of the involved genes, current knowledge about the potential association between these genetic alterations with both the *EGFR*, *PDGFRA*, *MDM4*, and *CDK4* gene expression profiles (GEP) and patient outcome, remains controversial and/or poorly investigated [18,19].

Here we analyzed the relationship between the pattern of expression of the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* genes, their corresponding CNA profile, and intragenic *EGFR* and *PDGFRA* deletions in 83 GBM tumors vs. 42 normal brain tissue samples. Subsequently, we investigated the potential impact of these GEP and CNA profiles on the outcome of GBM patients. Our findings about the frequency and type of gene amplification and its association with the corresponding GEP were validated in a large cohort of 264 GBM patients and 29 normal brain tissues for whom GEP data was publicly available in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository.

2. Results

2.1. *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* Gene Expression Levels in GBM vs. Normal Brain Tissues

Overall, median gene expression levels for the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* genes in normal brain tissues was of 0.92, 1.00, 1.01, and 0.96 (FC values), respectively (Table 1). Overall, GBM tumors ($n = 83$) showed higher expression levels for all four genes: 4.11, 3.07, 1.13, and 2.11 FC values

for the *EGFR* ($p < 0.01$), *CDK4* ($p < 0.01$), *MDM4* ($p = 0.06$), and *PDGFRA* ($p < 0.01$) genes, respectively (Table 1 and Figure 1). Higher expression levels for the *EGFR*, *PDGFRA*, *CDK4*, and *MDM4* genes in GBM tumor vs. normal brain tissues was further confirmed in those 264 primary GBM vs. 29 normal brain tissue samples from the GEO database with median FC values of 4.5, 4.4, 2.7, and 2.0 for the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* genes in the tumor vs. normal brain samples, respectively (Table 1).

Table 1. Epidermal growth factor receptor (*EGFR*), cyclin dependent kinase 4 (*CDK4*), mouse double minute 4 (*MDM4*), and platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*) gene expression levels in glioblastoma multiforme (GBM) tissues from our series (assessed by RT-QPCR) and from the Gene Expression Omnibus (GEO) database assessed with the HGU133Plus2 Affymetrix microarray.

Gene	Gene Expression Levels					
	Discovery Cohort				Validation Cohort	
	Normal Brain ($n = 42$)	GBM ($n = 83$)	GBM vs. Normal	p -Values	GBM vs. Normal ($n = 293$)	p -Values
<i>EGFR</i>	0.92	4.11	5.54	<0.01	4.5	<0.001
<i>CDK4</i>	1.00	3.07	3.88	<0.01	4.4	<0.001
<i>MDM4</i>	1.01	1.13	1.22	0.06	2.7	<0.001
<i>PDGFRA</i>	0.96	2.11	1.84	<0.01	2.0	<0.001

Results expressed as FC (fold change) values for RT-QPCR and gene expression arrays in tumor versus normal brain tissue samples studied in parallel in the discovery and the validation cohorts, respectively.

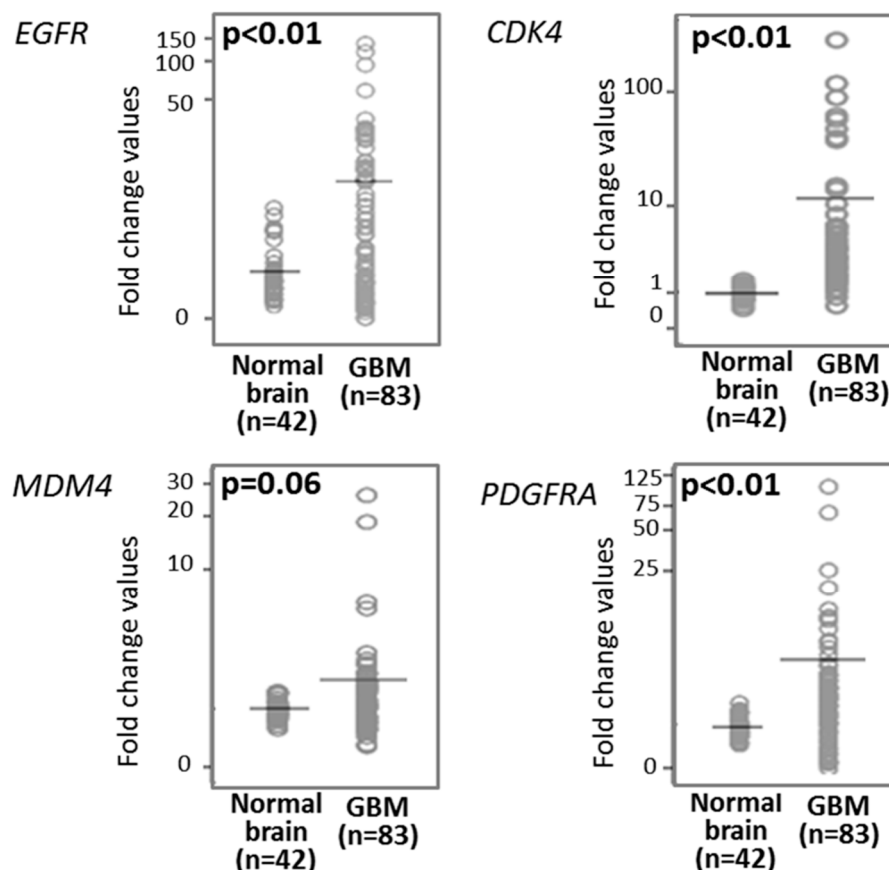


Figure 1. Epidermal growth factor receptor (*EGFR*), cyclin dependent kinase 4 (*CDK4*), mouse double minute 4 (*MDM4*), and platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*) gene expression levels in GBM ($n = 83$) vs. normal brain tissues ($n = 42$). (Non-parametric comparisons performed using the Mann–Whitney U test). (SPSS 25.0, IBM SPSS, Armonk, NY, USA).

Based on the levels of expression observed for each gene in individual tumor samples vs. normal brain, GBM cases were divided into two groups: (i) GBM patients with low/normal; and (ii) with significantly ($p < 0.001$) higher gene expression levels than those observed in normal brain (Table 2). Among all four genes, *CDK4* was the most frequently overexpressed gene (75/83 GBM tumors; 90%), followed by *EGFR* (58%) and *PDGFRA* (58%), and finally *MDM4* (33/83 cases; 40%) (Figure 2A). Overall, 14/83 tumors (17%) showed simultaneous overexpression of the four genes, 26 (31%) presented with 3/4 overexpressed genes, 29 showed two overexpressed genes (35%), and 12 had only one overexpressed gene (14%) (Figure 2B). Thus, the great majority of our GBM tumors showed amplification of at least one of the four genes investigated, whereas simultaneously low/normal expression levels for the four genes was only found in two samples (2%) (Figure 2A,B).

Table 2. Distribution of GBM according to the gene expression profiles (GEP) observed for the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* genes.

GBM Subsets	Gene (FC Cut-Off Value ^a)			
	<i>EGFR</i> (2.84)	<i>CDK4</i> (1.46)	<i>MDM4</i> (1.45)	<i>PDGFRA</i> (1.70)
Low/Normal Gene Expression				
N. of Samples (%)	35 (42%)	8 (9%)	50 (60%)	35 (42%)
FC Values	1.20 (0.06–2.83)	1.18 (0.58–1.42)	0.82 (0.58–1.41)	0.81 (0.04–1.68)
High-Gene Expression				
N. of Samples (%)	48 (58%)	75 (90%)	33 (40%)	48 (58%)
FC Values	17.08 (2.89–251.9)	3.10 (1.55–272.3)	1.76 (1.46–25.23)	3.28 (1.71–102.5)
<i>p</i> -Value *	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a FC (fold change) cut-off values shown between brackets were set at the 95 percentile values observed in normal brain tissue samples; * Comparison of gene expression levels by the Mann–Whitney U test. Results expressed as number (percentage) of cases or as median (range) FC values.

2.2. Association between the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* Gene Expression Profiles and Copy Number Alterations

The GEP and CNA pattern for the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* genes was available in 83/83, 68/83, 68/83, and 68/83 GBM tumor samples evaluated, respectively. Overall, *EGFR* was the most frequently amplified gene at the DNA level (36%), followed by *CDK4* (18%), *MDM4* (9%), and *PDGFRA* (7%) (Table 3). As expected, a clear association was observed between the *EGFR* gene copy number status and expression levels ($p < 0.001$). Thus, a high percentage ($p = 0.01$) of tumors displaying *EGFR* gene amplification showed overexpression of the *EGFR* gene (77% vs. 23% among non-amplified tumors). In addition, significant differences were found in the median FC values between amplified and non-amplified cases for both the *EGFR* and *MDM4* genes ($p < 0.001$ and $p = 0.02$, respectively) (Table 3). In contrast, no significant association was found between the GEP and CNA status for the *CDK4* and *PDGFRA* genes (Table 3).

2.3. Intragenic Deletion and GEP of the *EGFR* and *PDGFRA* Genes

EGFR intragenic deletions were detected in 39/83 (47%) cases. *EGFRvIII* was found in 38 of these 39 GBM (97%) (Figure 2C), the other case showing an isolated *EGFRvIVa* deletion in the absence of *EGFRvIII*. Of note, in five *EGFRvIII*-mutated GBM, this mutation coexisted with other *EGFR* mutations/deletions in heterozygous: *EGFRvII* in two (2%), *EGFRvIVa* in two (2%), and deletions of exon 25, exons 2–5 and exons 8–28 in one case each; one of these tumors presented simultaneously *EGFRvII*, *EGFRvIII*, *EGFRvIVa*, and del exons 2–5 (Supplementary Table S3). Overall, *EGFRvIII*, was

more frequently ($p < 0.001$) found in tumors carrying *EGFR* amplification (25/38; 66%) than in *EGFR* non-amplified tumors (13/38; 34%) (Figure 2C). Among these *EGFR*^{vIII+} cases, *EGFR* gene amplification was associated with chromosome 7 CNA, particularly with trisomy 7 found in 14/38 (37%) cases and other chromosome 7 polysomies detected in another 7/38 tumors (18%). Of note both alterations (trisomy 7 and chromosome 7 polysomies) were also found at lower frequencies 6/38 (16%) and 6/38 cases (16%), respectively ($p > 0.05$) among cases who had no *EGFR* gene amplification (Supplementary Table S3). Deletion of exons 8–9 of the *PDGFRA* gene was detected in only two GBM (2%), one of them showing amplification of the *PDGFRA* and *CDK4* genes.

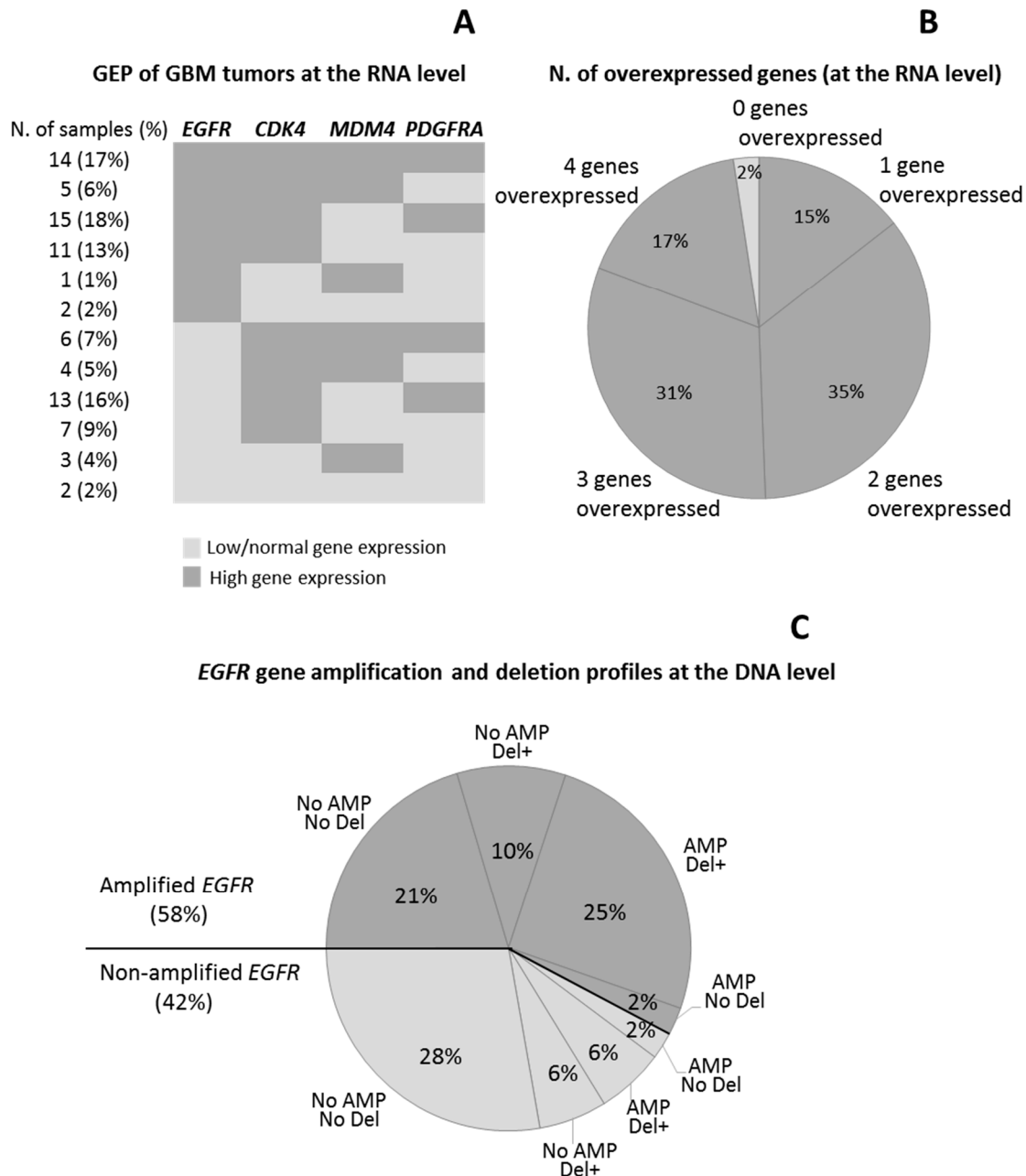


Figure 2. Distribution of GBM cases according to the pattern (A) and number (B) of overexpressed (*EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA*) genes, and the association between *EGFR* gene expression levels and the *EGFR* gene deletion/amplification profiles (C).

Table 3. Association between the copy number (CN) status and gene expression profile of the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* genes in GBM.

	CN Status (N. Cases and Percentage)		Gene Expression Profile of GBM		
			Low/Normal Expression	High Expression	<i>p</i> -Value
Amp <i>EGFR</i> (<i>n</i> = 83)	No (64%)	N. of Cases (%) FC	28 (53%) 1.14 (0.22–2.32)	25 (47%) 6.93 (2.89–76.74)	<0.001
	Yes (36%)	N. of Cases (%) FC	7 (23%) 1.67 (0.06–2.83)	23 (77%) 46.02 (7.45–251.94)	
	<i>p</i> -Value		0.10	<0.001	0.01 *
Amp <i>CDK4</i> (<i>n</i> = 68)	No (82%)	N. of Cases (%) FC	4 (7%) 1.13 (0.58–1.40)	52 (93%) 3.27 (1.55–117.40)	<0.001
	Yes (18%)	N. of Cases (%) FC	1 (8%) 1.2 (1.2)	11 (92%) 10.57 (1.57–89.07)	
	<i>p</i> -Value		1	0.08	0.87 *
Amp <i>MDM4</i> (<i>n</i> = 68)	No (91%)	N. of cases (%) FC	38 (61%) 0.86 (0.27–1.41)	24 (39%) 1.76 (1.46–5.65)	<0.001
	Yes (9%)	N. of cases (%) FC	2 (33%) 0.96 (0.55–1.36)	4 (67%) 12.09 (1.74–25.23)	
	<i>p</i> -Value		0.85	0.02	0.18 *
Amp <i>PDGFRA</i> (<i>n</i> = 68)	No (93%)	N. of Cases (%) FC	26 (41%) 0.63 (0.04–1.55)	37 (59%) 3.27 (1.71–66.88)	<0.001
	Yes (7%)	N. of Cases (%) FC	1 (20%) 0.16 (0.16)	4 (80%) 3.34 (2.77–102.47)	
	<i>p</i> -Value		0.25	0.51	0.35 *

CN: copy number; FC: fold change; *: Pearson Chi-Square test for comparison of patient distribution. Results expressed as number of cases (percentage) or as median FC values (range).

2.4. Impact of *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* Gene Expression Profiles on Patient Outcome

The pattern of expression (low/normal vs. high expression) of the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4* and *PDGFRA* genes did not show an association with the clinical features of GBM at diagnosis (Supplementary Table S4). No differences in the GEP for the four genes investigated alone or in different combinations among them were observed according to age and sex. In addition, the pattern of expression of the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* genes, did not show an impact on patient overall survival ($p > 0.05$, respectively) (Figure 3) neither independently nor of the different genes combined. For the *EGFR* gene, this lack of association was further confirmed, also when the presence of intragenic *EGFR* deletions and *EGFR* gene amplification were taken into consideration (Supplementary Figure S1).

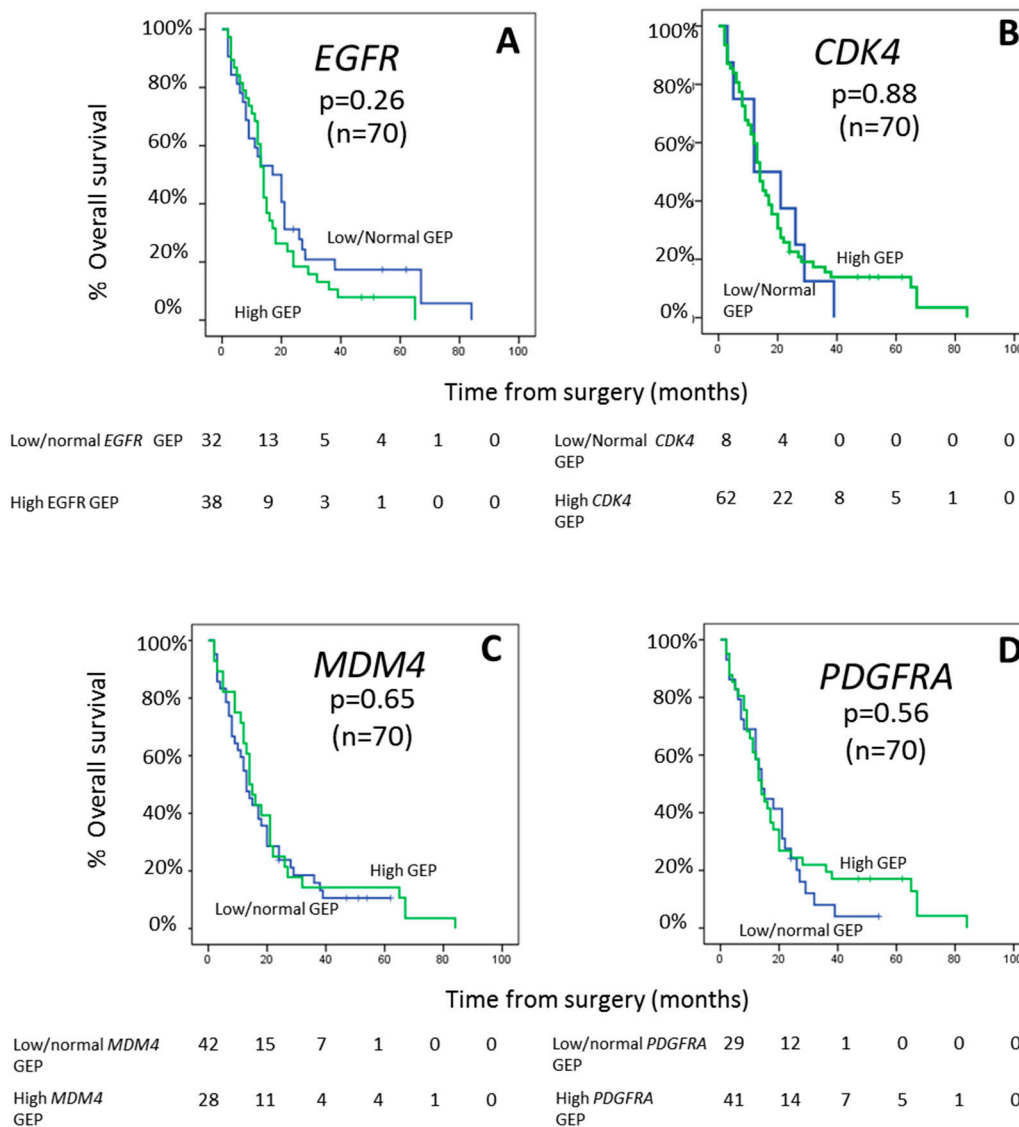


Figure 3. Prognostic impact of *EGFR* (A), *CDK4* (B), *MDM4* (C), and *PDGFRA* (D) GEP on overall survival of GBM patients.

3. Discussion

The GEP of GBM has been suggested to be of some prognostic value [2,5,6,19–21]. Although, controversial results exist in the literature in this regard, and several studies show no predictive value for GEP analyses in GBM [22,23]. Such discrepancies might be, at least in part, due to the heterogeneity of the genetic mechanisms underlying the distinct GEP, including e.g., amplification and mutations of the overexpressed genes. To the best of our knowledge, no study has been reported so far in the literature in which detailed analyses of the GEP together with the most common genetic alterations of the most frequently deregulated genes have been simultaneously investigated in GBM.

Here we investigated for the first time the gene expression profile of four genes (*EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA*) most frequently amplified at the DNA level in GBM [4] and its potential association with both underlying gene amplification and/or intragenic deletions, and patient outcome. Overall, our results showed highly variable expression profiles for all four genes investigated, overexpression of one or more of these four genes (vs. normal brain tissues) being observed in virtually every GBM. Of note *CDK4* was the most frequently overexpressed gene, followed by *EGFR* and *PDGFRA*, while *MDM4* was overexpressed in a smaller (less than half) fraction of the patients. Interestingly, however, among cases showing overexpression of these four genes, *EGFR* was that

showing the highest expression levels. These results about the GEP of GBM were (fully) confirmed in a larger series of 264 GBM cases from publicly available data. In turn, they are in line with previous studies that have demonstrated the existence of altered but highly heterogeneous gene expression profiles (i.e., overexpression) in primary GBM including other studies in smaller patient series [24,25]. In this regard, it should also be noted that the different cells in the same tumor might have distinct gene mutations, and distinct tumor cell subpopulations can be found in different tumor areas (e.g., in the tumor core and the leading edge) further contributing to the observed inter-tumor heterogeneity.

In recent years, accumulated evidence suggested that amplification of the *EGFR* and other genes might play a critical role in the oncogenesis and clinical behavior of GBM [22,26,27]. Despite this, with the exception of a recent study [28], no clear association has been reported in the literature between the GEP and the genetic alterations of individual genes in GBM [29]. In order to investigate the potential association between overexpression of *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA*, subsequent analysis of gene amplification was performed at the DNA level. Overall, amplification of *EGFR* was present in a large proportion of our GBM. In contrast, amplification of the *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* genes was restricted to a smaller fraction of the patients. As might be expected, GBM that showed overexpression of *EGFR* and *MDM4*, more frequently displayed amplification of these genes at the DNA level, but with still a significant number of cases showing overexpression of *EGFR* and *MDM4* in the absence of gene amplification. In contrast, only a tendency (in the absence of significant statistically association) was observed for an association between overexpression and amplification of the *CDK4* and *PDGFRA* genes. Altogether these results suggest that overexpression of one or more of the four genes investigated (*EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA*) is a hallmark of GBM, which cannot be fully explained on the basis of genetic amplification of the corresponding genes, even when gains of chromosome 7 (in the absence of *EGFR* gene amplification) were also considered.

Based on these results, we then investigated the potential impact of other genetic alterations (i.e., intragenic deletions/mutations) that are frequently observed in the *EGFR* and *PDGFRA* genes, on the expression profile of both genes at the RNA level. In line with previous observations, our results showed that *EGFR* is the most frequently mutated/partially deleted gene in GBM [22,26,30]. As expected, the majority of cases showing intragenic *EGFR* deletions had the *EGFRvIII* variant, alone or in combination with other *EGFR* gene deletions, in association with *EGFR* gene amplification at the DNA level and *EGFR* (RNA) overexpression. Mechanisms for gene overexpression due to mutated *EGFR* gene in GBM include N/C-terminal deletions and deletions of other exons which lead to an oncogenic *EGFR* protein in some mutations by keeping in the *EGFR* protein active conformation with an impact also on the RNA expression level of several other genes. Intragenic deletions of the other three genes investigated were rare and they were restricted to a few cases carrying *PDGFRA* gene mutations/deletions. These observations support a critical role for intragenic *EGFR* gene deletions and *EGFR* gene amplification since cross-talk between the intragenic *EGFRvIII* deleted variant and *EGFR* amplification, leads to constitutive activation of the PI3K-AKT signaling pathway and, which might ultimately contribute to explain malignant transformation in GBM [31], as previously suggested by others [22,30]. The close association found here between overexpression of *EGFR* at the RNA level, *EGFR* gene DNA amplification and *EGFRvIII* is in line with previous data from the literature [22,32,33] although there is also the possibility that the *EGFR* gene is not mutated in the two alleles. However, *EGFR* mutations/deletions in homo or heterozygosity (neither alone nor in combination with *EGFR* gene amplification) could fully explain overexpression of the *EGFR* gene. Therefore, our results suggest that despite overexpression of *EGFR*, *PDGFRA*, *CDK4*, and/or *MDM4* is a hallmark of GBM, increased expression of these genes is not fully explained by underlying genetic amplification and/or mutations/deletions, other mechanisms potentially leading also to activation of these genes in GBM. In this regard, previous studies suggested that deregulation of *EGFR*, might also be associated (e.g., induced) by deregulated expression of other genes, particularly genes that involve the PI3-kinase and Akt signaling pathways, such as *CDK4*, leading to an altered cell proliferation and survival. In

line with this hypothesis, Liu et al. have also recently demonstrated a synergistic anti-GBM activity of inhibitors of *EGFR* and *CDK4* [34].

Despite all the above, no clear association was found in our study between the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* gene expression profile and/or the underlying alterations in these four genes and survival of GBM patients, neither when the GEP of the four genes was separately considered nor when it was investigated in combination. Previous studies suggested an association between *EGFR* overexpression and clinical outcome [35,36], both in younger and older GBM patients [27,37,38]. Likewise, an association between *EGFR* amplification and survival has also been previously documented in large series of primary GBM patients [38,39]. However, while in some series *EGFR* overexpression and/or amplification was associated with poorer outcome [40], in others it emerged as a favorable prognostic factor [2,6]; in line with our results, others [22,23] could not confirm this prognostic impact of *EGFR* gene expression and amplification profiles.

4. Material and Methods

4.1. Patients and Samples

EGFR, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* expression was analyzed in a total of 126 frozen samples from adult patients (≥ 18 years; 50 males and 33 females) with histopathological WHO diagnosis of primary GBM (WHO grade IV gliomas). Most (83/126) samples were from GBM tumors diagnosed as per the WHO criteria [41] 50 males and 33 females; mean age of 59 ± 14 years (range: 21–84 years) who underwent surgery at diagnosis, either ($n = 58$) at the Neurosurgery Service of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain) or ($n = 25$) at the University Hospital of Coimbra (Coimbra, Portugal) [25]. From the 83 patients, 34 (47%) underwent complete tumor resection, 31 patients (42%) had a partial tumor resection, and eight (11%) did not undergo surgery. At diagnosis 12 patients (16%) had a Karnofsky performance status (KPS) < 50 , 25 patients (23%) between 60 and 70 KPS, 31 patients (41%) between 80 and 90 KPS, and the remaining seven patients (9%) had a KPS index of 100. All patients received standard (similar) therapy protocols and those who died within the first month after surgery, were excluded from the survival analyses. Imprints of individual fresh tumor tissues from these 83 patients were placed in polylysine slides and stored for 3 h at 4 °C before fixation in methanol/acetic acid 3:1 (vol/vol) for further interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH) analysis. Remaining tissue samples from these same cases not required for routine diagnostics were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until used. Each sample was obtained after surgical resection of the tumor, from patients who had given their prior informed consent according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local ethics committees of the two participating institutions: Comité de ética de la investigación con medicamentos (CEIm)_Complejo Hospitalario de Salamanca (PI16/00476).

The remaining 42/126 samples corresponded to non-tumoral normal brain tissue specimens, and they included one commercially available normal brain tumor RNA sample (AM7962; Life Technologies, Carlsbad, CA) and 41 samples from age- and sex-matched healthy donors kindly provided by the Principado de Asturias Biobank (PT17/0015/0023 member of the Spanish National Biobank Network Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain). The *DKMG/EGFRvIII* cell line (CL 01008-CLTH, Celther Polska Laboratory, Le-Perray-en-Yvelines, France) was used as positive control for the *EGFRvIII* gene mutation.

Apart from the above listed samples, data derived from GEP arrays of a total of 293 samples from 10 publicly available case-control series corresponding to 264 GBM patients and 29 normal brain tissues available at the GEO repository, were further analyzed as a validation cohort for the GEP identified for the four genes investigated (Supplementary Table S1) with the HGU133Plus2 Affymetrix microarrays [20,21,42–48].

4.2. Gene Expression Profiling Studies

DNA and RNA samples were extracted from frozen tumor specimens using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and the easy-BLUETM total RNA extraction kit (iNtRON Biotechnology Inc, Seongnam, South Korea) and RNeasy Mini Kit (QIAGEN), respectively. Subsequently, cDNA was synthesized from total RNA (2 µg in 20 µL) treated with 1 µg DNase I (Sigma-Aldrich-Merck, Kenilworth, NJ, UK) using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied BiosystemsTM, Foster City, CA, USA). cDNA was used for *EGFR*, *PDGFRA*, *CDK4*, and *MDM4* gene expression analysis based on an RQ-PCR assay and the BioMark HD System (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA), using predesigned FAM-MGB labeled TaqMan[®] probes (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for the *EGFR* (hs00193306_m1), *PDGFRA* (hs00998018_m1), *CDK4* (hs00364847_m1), and *MDM4* (Hs00967245_m1) genes (Supplementary Table S2). Two housekeeping genes were employed as internal controls to normalize gene expression with identical results: the TATA-Box Binding Protein (TBP; Hs00427620_m1) and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*GAPDH*; Hs99999905_m1) genes. Ct values were obtained for each sample and deltaCt values calculated to determine the level of expression in a sample by comparing the Ct of each gene with respect to both housekeeping genes (TBP and *GAPDH*), Ct mean values for TBP being more similar to the four genes investigated than the *GAPDH* gene expression levels. RQ-PCR assays were performed with the GE 96.96 Dynamic ArrayTM integrated fluidic circuit (IFC) following the recommendations of the manufacturer (Fluidigm) and the following steps: (i) thermal mix (2 min at 50 °C, 30 min at 70 °C, and 10 min at 25 °C); (ii) Uracil N-glycosylase (UNG, decontaminate) step (2 min at 50 °C and 10 min at 96.5 °C); and (iii) PCR amplification (40 PCR cycles of denaturation at 96 °C for 15 s and annealing at 60 °C for 1 min). To determine the level of expression of each individual gene, deltaCt (Δ Ct) values were calculated based on differences observed between the threshold cycle (Ct) obtained for each target gene minus the Ct corresponding to the TBP housekeeping gene. Fold change (FC) values were also calculated for each target sequence and gene per GBM tumor. Cut-off values used to define high or low gene expression levels for individual genes were based on FC values vs. the median values of control (normal brain tissue) samples.

Data derived from the Human Genome U133Plus2.0 arrays were analyzed using Bioconductor and R-package tools (<https://www.R-project.org/>). Robust multi-array average (RMA) expression was used for data normalization. Variability due to each individual GEO database was removed using the ComBat procedure included in the sva R-package which shrinks the variance among independent series. Gene symbols for the 54,675 probes investigated were annotated, and those without associated information, as well as those corresponding to Affymetrix control probes, were excluded from further analyses. In contrast, multiple probes corresponding to the same gene were kept in the analysis for a total of 44,723 probe sets corresponding to 21,336 genes. Gene expression data was recorded as log₂ expression intensity values and differences in gene expression between GBM and normal brain tissues was expressed as FC values for each gene investigated, where FC > 2 corresponded to increased expression and FC < 2 corresponded to normal or lower gene expression levels in GBM vs normal brain tissue.

4.3. Assessment of *EGFR* and *PDGFRA* Intragenic Deletions

EGFRvII, *EGFRvIII*, *EGFRvIV* deletion and *PDGFRA* deletion of exons 8–9 were all analyzed by RQ-PCR using the BioMark HD System (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) and Custom TaqMan[®] probes and assays, as described above. For the *EGFRvIII* deletion an RQ-PCR SYBRTMGreen assay was designed based on primers and a probe that exclusively bind to the *EGFR* gene sequences if there is deletion of exons 2 to 7 (the presence of a non-mutated allele or unmutated cells in the same sample, going thereby undetected) and analyzed in a LightCycler 2.0 thermocycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) [49], while for the identification of the *EGFRvII* and *EGFRvIV* mutations, and *EGFR* deletion of exons 2–5 and exons 12–13, a conventional PCR assay followed by Sanger

sequencing was used (ABI prism 3130xl, Applied Biosystems). Custom designed primers and probes used are listed in Supplementary Table S2.

4.4. Interphase Fluorescence In Situ Hybridization Studies

The *EGFR/CEP7* dual color probe ($n = 83$) and the *PDGFRA* (4q12) tri-color break-apart probe kit ($n = 40$) (Vysis Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) plus the *CDK4/CEP12* probe ($n = 40$) (Cytotest, Rockville, MD, USA) and the *MDM4* (1q32/SE 1) probe ($n = 40$) (Kreatech Biotechnology BV, Amsterdam, The Netherlands) were used for iFISH studies, following previously described methods [50]. iFISH Gene amplification was defined for each of the four genes analyzed, whenever ≥ 7 fluorescent signals were present; below this cut-off (3–6 fluorescence signals) tumors with three or more copies of a gene were considered to have trisomy and polysomy, respectively.

4.5. Other Statistical Analyses

The SPSS software (SPSS 25.0, IBM SPSS, Armonk, NY, USA) was used for further statistical analyses. The χ^2 and Mann–Whitney U tests were used to establish the statistical significance of differences observed between groups for categorical and continuous variables, respectively. Gene expression cut-offs were defined based on 95 percentile gene expression values observed in normal brain tissues. Overall survival curves were plotted by the Kaplan and Meier method and compared using the (two-sided) log-rank test, for GBM patients who survived for >1 month after surgery and that had subsequently died or been followed for ≥ 18 months (in case of patients that remained alive at the moment of closing this study: 70/83 patients).

5. Conclusions

Our results highlight the heterogeneity of *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* gene expression profiles in GBM, which can only be partially explained by underlying gene amplification and/or intragenic deletions, revealing the complexity of the mechanisms involved in overexpression of these genes in individual GBM. Independent of the molecular mechanisms involved, the expression profile of the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* genes does not show a clear impact on the behavior of the disease and patient outcome.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/1/231/s1>, Figure S1: Prognostic impact of the GEP of *EGFR* on overall survival of GBM patients distributed according to the pattern of intragenic *EGFR* deletions and gene expression levels (panel A), and the *EGFR* amplification status (panel B); Table S1: Glioblastoma patient series ($n = 10$) used as validation cohort with publicly available gene expression data in the GEO genomic database ($n = 293$ samples) about tumor ($n = 264$) and normal brain ($n = 29$) tissue samples; Table S2: Probe and primer sequences used to quantify the amount of expression of the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* genes by RQ-PCR and/or conventional PCR assays; Table S3: GBM tumors displaying *EGFR* amplification and *EGFRvIII* ($n = 38$) deletion and other intragenic deletions of the *EGFR* gene coexisting in the same tumor; Table S4: Relationship between *EGFR*, *CDK4*, *MDM4*, and *PDGFRA* gene expression profiles and the clinical features of the disease at diagnosis.

Author Contributions: All authors have contributed significantly to this article. Methodology, A.-L.V., H.T., D.A., Á.O. (Álvaro Otero), D.P., L.R. and P.S.; Investigation, M.J.-A., C.P., M.G.-T., N.G.-G., A.B.N.-L. and P.G.-V.; Writing—original draft preparation, M.G.-T., A.O. (Alberto Orfao) and M.D.T.; Supervision; M.D.T., and A.O. (Alberto Orfao); Funding Acquisition, M.D.T. and A.O. (Alberto Orfao). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación and Ministerio de Economía y Competitividad (RD12/0036/0048, AES PI16/00476-FONDOS FEDER and CB16/12/00400).

Acknowledgments: We want to acknowledge the Principado de Asturias Biobank (PT17/0015/0023), jointly financed by Servicio de Salud del Principado de Asturias, Instituto de Salud Carlos III and Fundación Bancaria Cajastur and integrated in the Spanish National Biobanks Network for its collaboration support in providing normal brain tissue samples, as well as the National Bank of DNA Carlos III (University of Salamanca, Salamanca, Spain) and the DNA Sequencing Service (Nucleus) of the University of Salamanca (Salamanca, Spain).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Crespo, I.; Vital, A.L.; Gonzalez-Tablas, M.; Patino Mdel, C.; Otero, A.; Lopes, M.C.; de Oliveira, C.; Domingues, P.; Orfao, A.; Taberero, M.D. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 1820–1833. [[CrossRef](#)]
2. Bienkowski, M.; Piaskowski, S.; Stoczynska-Fidelus, E.; Szybka, M.; Banaszczyk, M.; Witusik-Perkowska, M.; Jesien-Lewandowicz, E.; Jaskolski, D.J.; Radoniak-Zaluska, A.; Jesionek-Kupnicka, D.; et al. Screening for EGFR amplifications with a novel method and their significance for the outcome of glioblastoma patients. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e65444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Szerlip, N.J.; Pedraza, A.; Chakravarty, D.; Azim, M.; McGuire, J.; Fang, Y.; Ozawa, T.; Holland, E.C.; Huse, J.T.; Jhanwar, S.; et al. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 3041–3046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gonzalez-Tablas, M.; Crespo, I.; Vital, A.L.; Otero, A.; Nieto, A.B.; Sousa, P.; Patino-Alonso, M.C.; Corchete, L.A.; Tao, H.; Rebelo, O.; et al. Prognostic stratification of adult primary glioblastoma multiforme patients based on their tumor gene amplification profiles. *Oncotarget* **2018**, *9*, 28083–28102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Montano, N.; Cenci, T.; Martini, M.; D’Alessandris, Q.G.; Pelacchi, F.; Ricci-Vitiani, L.; Maira, G.; De Maria, R.; Larocca, L.M.; Pallini, R. Expression of EGFRvIII in glioblastoma: Prognostic significance revisited. *Neoplasia* **2011**, *13*, 1113–1121. [[CrossRef](#)]
6. Hobbs, J.; Nikiforova, M.N.; Fardo, D.W.; Bortoluzzi, S.; Cieply, K.; Hamilton, R.L.; Horbinski, C. Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas. *Am. J. Surg. Pathol.* **2012**, *36*, 1186–1193. [[CrossRef](#)]
7. Wong, A.J.; Ruppert, J.M.; Bigner, S.H.; Grzeschik, C.H.; Humphrey, P.A.; Bigner, D.S.; Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 2965–2969. [[CrossRef](#)]
8. Humphrey, P.A.; Gangarosa, L.M.; Wong, A.J.; Archer, G.E.; Lund-Johansen, M.; Bjerkvig, R.; Laerum, O.D.; Friedman, H.S.; Bigner, D.D. Deletion-mutant epidermal growth factor receptor in human gliomas: Effects of type II mutation on receptor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *178*, 1413–1420. [[CrossRef](#)]
9. Ekstrand, A.J.; Sugawa, N.; James, C.D.; Collins, V.P. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4309–4313. [[CrossRef](#)]
10. Frederick, L.; Wang, X.Y.; Eley, G.; James, C.D. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1383–1387.
11. Fenstermaker, R.A.; Ciesielski, M.J. Deletion and tandem duplication of exons 2–7 in the epidermal growth factor receptor gene of a human malignant glioma. *Oncogene* **2000**, *19*, 4542–4548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Thorne, A.H.; Zanca, C.; Furnari, F. Epidermal growth factor receptor targeting and challenges in glioblastoma. *Neuro-Oncology* **2016**, *18*, 914–918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cho, J.; Pastorino, S.; Zeng, Q.; Xu, X.; Johnson, W.; Vandenberg, S.; Verhaak, R.; Cherniack, A.D.; Watanabe, H.; Dutt, A.; et al. Glioblastoma-derived epidermal growth factor receptor carboxyl-terminal deletion mutants are transforming and are sensitive to EGFR-directed therapies. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 7587–7596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Johnson, B.E.; Mazor, T.; Hong, C.; Barnes, M.; Aihara, K.; McLean, C.Y.; Fouse, S.D.; Yamamoto, S.; Ueda, H.; Tatsuno, K.; et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science* **2014**, *343*, 189–193. [[CrossRef](#)]
15. Martinho, O.; Longatto-Filho, A.; Lambros, M.B.; Martins, A.; Pinheiro, C.; Silva, A.; Pardal, F.; Amorim, J.; Mackay, A.; Milanezi, F.; et al. Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 973–982. [[CrossRef](#)]
16. Brennan, C.W.; Verhaak, R.G.; McKenna, A.; Campos, B.; Nounshmehr, H.; Salama, S.R.; Zheng, S.; Chakravarty, D.; Sanborn, J.Z.; Berman, S.H.; et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **2013**, *155*, 462–477. [[CrossRef](#)]

17. Furgason, J.M.; Koncar, R.F.; Michelhaugh, S.K.; Sarkar, F.H.; Mittal, S.; Sloan, A.E.; Barnholtz-Sloan, J.S.; Bahassi, M. Whole genome sequence analysis links chromothripsis to EGFR, MDM2, MDM4, and CDK4 amplification in glioblastoma. *Oncoscience* **2015**, *2*, 618–628. [[CrossRef](#)]
18. Aldape, K.; Zadeh, G.; Mansouri, S.; Reifenberger, G.; von Deimling, A. Glioblastoma: Pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* **2015**, *129*, 829–848. [[CrossRef](#)]
19. Kawaguchi, A.; Yajima, N.; Tsuchiya, N.; Homma, J.; Sano, M.; Natsumeda, M.; Takahashi, H.; Fujii, Y.; Kakuma, T.; Yamanaka, R. Gene expression signature-based prognostic risk score in patients with glioblastoma. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 1205–1210. [[CrossRef](#)]
20. Lee, Y.; Scheck, A.C.; Cloughesy, T.F.; Lai, A.; Dong, J.; Farooqi, H.K.; Liao, L.M.; Horvath, S.; Mischel, P.S.; Nelson, S.F. Gene expression analysis of glioblastomas identifies the major molecular basis for the prognostic benefit of younger age. *BMC Med. Genom.* **2008**, *1*, 52. [[CrossRef](#)]
21. Reifenberger, G.; Weber, R.G.; Riehm, V.; Kaulich, K.; Willscher, E.; Wirth, H.; Gietzelt, J.; Hentschel, B.; Westphal, M.; Simon, M.; et al. Molecular characterization of long-term survivors of glioblastoma using genome- and transcriptome-wide profiling. *Int. J. Cancer* **2014**, *135*, 1822–1831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Felsberg, J.; Hentschel, B.; Kaulich, K.; Gramatzki, D.; Zacher, A.; Malzkorn, B.; Kamp, M.; Sabel, M.; Simon, M.; Westphal, M.; et al. Epidermal Growth Factor Receptor Variant III (EGFRvIII) Positivity in EGFR-Amplified Glioblastomas: Prognostic Role and Comparison between Primary and Recurrent Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 6846–6855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kastenhuber, E.R.; Huse, J.T.; Berman, S.H.; Pedraza, A.; Zhang, J.; Suehara, Y.; Viale, A.; Cavatore, M.; Heguy, A.; Szerlip, N.; et al. Quantitative assessment of intragenic receptor tyrosine kinase deletions in primary glioblastomas: Their prevalence and molecular correlates. *Acta Neuropathol.* **2014**, *127*, 747–759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Eskilsson, E.; Rosland, G.V.; Solecki, G.; Wang, Q.; Harter, P.N.; Graziani, G.; Verhaak, R.G.W.; Winkler, F.; Bjerkvig, R.; Miletic, H. EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro-Oncology* **2018**, *20*, 743–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Vital, A.L.; Taberner, M.D.; Castrillo, A.; Rebelo, O.; Tao, H.; Gomes, F.; Nieto, A.B.; Resende Oliveira, C.; Lopes, M.C.; Orfao, A. Gene expression profiles of human glioblastomas are associated with both tumor cytogenetics and histopathology. *Neuro-Oncology* **2010**, *12*, 991–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. van den Bent, M.J.; Gao, Y.; Kerkhof, M.; Kros, J.M.; Gorlia, T.; van Zwieten, K.; Prince, J.; van Duinen, S.; Silveira, P.A.; Taphoorn, M.; et al. Changes in the EGFR amplification and EGFRvIII expression between paired primary and recurrent glioblastomas. *Neuro-Oncology* **2015**, *17*, 935–941. [[CrossRef](#)]
27. Crespo, I.; Tao, H.; Nieto, A.B.; Rebelo, O.; Domingues, P.; Vital, A.L.; Patino Mdel, C.; Barbosa, M.; Lopes, M.C.; Oliveira, C.R.; et al. Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: Impact on gene expression levels. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46088. [[CrossRef](#)]
28. Lassman, A.B.; Roberts-Rapp, L.; Sokolova, I.; Song, M.; Pestova, E.; Kular, R.; Mullen, C.; Zha, Z.; Lu, X.; Gomez, E.; et al. Comparison of Biomarker Assays for EGFR: Implications for Precision Medicine in Patients with Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 3259–3265. [[CrossRef](#)]
29. Wang, S.; Liu, F.; Wang, Y.; Fan, W.; Zhao, H.; Liu, L.; Cen, C.; Jiang, X.; Sun, M.; Han, P. Integrated analysis of 34 microarray datasets reveals CBX3 as a diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 179. [[CrossRef](#)]
30. Maire, C.L.; Ligon, K.L. Molecular pathologic diagnosis of epidermal growth factor receptor. *Neuro-Oncology* **2014**, *16*. [[CrossRef](#)]
31. Chakraborty, S.; Li, L.; Puliyappadamba, V.T.; Guo, G.; Hatanpaa, K.J.; Mickey, B.; Souza, R.F.; Vo, P.; Herz, J.; Chen, M.R.; et al. Constitutive and ligand-induced EGFR signalling triggers distinct and mutually exclusive downstream signalling networks. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Li, L.; Chakraborty, S.; Yang, C.R.; Hatanpaa, K.J.; Ciferri, D.J.; Puliyappadamba, V.T.; Rehman, A.; Jiwani, A.J.; Mickey, B.; Madden, C.; et al. An EGFR wild type-EGFRvIII-HB-EGF feed-forward loop regulates the activation of EGFRvIII. *Oncogene* **2014**, *33*, 4253–4264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Li, L.; Puliyappadamba, V.T.; Chakraborty, S.; Rehman, A.; Vemireddy, V.; Saha, D.; Souza, R.F.; Hatanpaa, K.J.; Koduru, P.; Burma, S.; et al. EGFR wild type antagonizes EGFRvIII-mediated activation of Met in glioblastoma. *Oncogene* **2015**, *34*, 129–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Liu, L.; Backlund, L.M.; Nilsson, B.R.; Grander, D.; Ichimura, K.; Goike, H.M.; Collins, V.P. Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas. *J. Mol. Med.* **2005**, *83*, 917–926. [[CrossRef](#)]
35. Simmons, M.L.; Lamborn, K.R.; Takahashi, M.; Chen, P.; Israel, M.A.; Berger, M.S.; Godfrey, T.; Nigro, J.; Prados, M.; Chang, S.; et al. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1122–1128.
36. Wong, K.K.; Rostomily, R.; Wong, S.T.C. Prognostic Gene Discovery in Glioblastoma Patients using Deep Learning. *Cancers* **2019**, *11*, 53. [[CrossRef](#)]
37. Mizoguchi, M.; Betensky, R.A.; Batchelor, T.T.; Bernay, D.C.; Louis, D.N.; Nutt, C.L. Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: Correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, 1181–1188. [[CrossRef](#)]
38. Houillier, C.; Lejeune, J.; Benouaich-Amiel, A.; Laigle-Donadey, F.; Criniere, E.; Mokhtari, K.; Thillet, J.; Delattre, J.Y.; Hoang-Xuan, K.; Sanson, M. Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer* **2006**, *106*, 2218–2223. [[CrossRef](#)]
39. Costa, B.M.; Viana-Pereira, M.; Fernandes, R.; Costa, S.; Linhares, P.; Vaz, R.; Pinheiro, C.; Lima, J.; Soares, P.; Silva, A.; et al. Impact of EGFR genetic variants on glioma risk and patient outcome. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2011**, *20*, 2610–2617. [[CrossRef](#)]
40. Li, J.; Liang, R.; Song, C.; Xiang, Y.; Liu, Y. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in glioma patients. *OncoTargets Ther.* **2018**, *11*, 731–742. [[CrossRef](#)]
41. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sun, L.; Hui, A.M.; Su, Q.; Vortmeyer, A.; Kotliarov, Y.; Pastorino, S.; Passaniti, A.; Menon, J.; Walling, J.; Bailey, R.; et al. Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 287–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Murat, A.; Migliaiacca, E.; Gorlia, T.; Lambiv, W.L.; Shay, T.; Hamou, M.F.; de Tribolet, N.; Regli, L.; Wick, W.; Kouwenhoven, M.C.; 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*, 3015–3024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wiedemeyer, R.; Brennan, C.; Heffernan, T.P.; Xiao, Y.; Mahoney, J.; Protopopov, A.; Zheng, H.; Bignell, G.; Furnari, F.; Cavenee, W.K.; et al. Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell* **2008**, *13*, 355–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Grzmil, M.; Morin, P., Jr.; Lino, M.M.; Merlo, A.; Frank, S.; Wang, Y.; Moncayo, G.; Hemmings, B.A. MAP kinase-interacting kinase 1 regulates SMAD2-dependent TGF-beta signaling pathway in human glioblastoma. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2392–2402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Auvergne, R.M.; Sim, F.J.; Wang, S.; Chandler-Militello, D.; Burch, J.; Al Fanek, Y.; Davis, D.; Benraiss, A.; Walter, K.; Achanta, P.; et al. Transcriptional differences between normal and glioma-derived glial progenitor cells identify a core set of dysregulated genes. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 2127–2141. [[CrossRef](#)]
47. Lu, T.; Aron, L.; Zullo, J.; Pan, Y.; Kim, H.; Chen, Y.; Yang, T.H.; Kim, H.M.; Drake, D.; Liu, X.S.; et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer’s disease. *Nature* **2014**, *507*, 448–454. [[CrossRef](#)]
48. Griesinger, A.M.; Josephson, R.J.; Donson, A.M.; Mulcahy Levy, J.M.; Amani, V.; Birks, D.K.; Hoffman, L.M.; Furtek, S.L.; Reigan, P.; Handler, M.H.; et al. Interleukin-6/STAT3 Pathway Signaling Drives an Inflammatory Phenotype in Group A Ependymoma. *Cancer Immunol. Res.* **2015**, *3*, 1165–1174. [[CrossRef](#)]
49. Yoshimoto, K.; Dang, J.; Zhu, S.; Nathanson, D.; Huang, T.; Dumont, R.; Seligson, D.B.; Yong, W.H.; Xiong, Z.; Rao, N.; et al. Development of a real-time RT-PCR assay for detecting EGFRvIII in glioblastoma samples. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 488–493. [[CrossRef](#)]
50. Vital, A.L.; Taberner, M.D.; Crespo, I.; Rebelo, O.; Tao, H.; Gomes, F.; Lopes, M.C.; Orfao, A. Intratumoral patterns of clonal evolution in gliomas. *Neurogenetics* **2010**, *11*, 227–239. [[CrossRef](#)]



Supplementary Table 1. Glioblastoma patient series (n=10) used as validation cohort with publicly available gene expression data in the GEO genomic data base (n=293 samples) about tumor (n=264) and normal brain (n=29) tissue samples.

Series code	Type of sample		Study reference
	Normal brain tissue (n=29)	GBM tumor tissue (n=264)	
GSE43289	-	26	Vital A <i>et al.</i> Neuro Oncol 2010 ²²
GSE4290	-	67	Sun L <i>et al.</i> Cancer Cell 2006 ²³
GSE7696	-	68	Murat J <i>et al.</i> Clin Oncol 2008 ²⁴
GSE9200	-	13	Wiedemeyer R <i>et al.</i> Cancer Cell 2008 ²⁵
GSE13041	-	8	Lee Y <i>et al.</i> BMC Med Genomics 2008 ²⁶
GSE15824	-	10	Grzmil M <i>et al.</i> Cancer Res 2011 ²⁷
GSE29796	-	4	Auvergne R <i>et al.</i> Cell Rep 2013 ²⁸
GSE53733	-	68	Reifenberger G <i>et al.</i> Int J Cancer 2014 ²⁹
GSE53890	21	-	Lu T <i>et al.</i> Nature 2014 ³⁰
GSE66354	8	-	Griesinger AM <i>et al.</i> Immunol Res 2015 ³¹

*: 11 GBM patients from the GSE43289 series were simultaneously evaluated with an SNP-array (GSE42631) and a GEP-array (GSE43289) allowing for direct comparison of tumor copy number status and gene expression data for the *EGFR*, *CDK4*, *MDM4* and *PDGFRA* genes.

Supplementary Table 2. Probe and primer sequences used to quantify the amount of expression of the EGFR, CDK4, MDM4 and PDGFRA genes by RQ-PCR and/or conventional PCR assays.

Gene	Targeted gene deletion	Type of PCR	Primers/Probes
<i>EGFR</i>	<i>EGFRvIII</i>	SYBR™Green RQ-PCR	FW: 5'-GGCTCTGGAGGAAAAGAAAGGTAAT-3' RV: 5'-TCCTCCATCTCATAGCTGTCG-3'
		TaqMan® RQ-PCR	FW: 5'-GTCGGGCTCTGGAGGAAAAG-3' RV: 5'-ATCACGGCTCGTGCGT-3' TQ: 5'-AAAGGTAATTATGTGGTGACAG-3'
		Conventional PCR	FW: 5'-GGGCTCTGGAGGAAAAGAAA-3' RV: 5'-AGCAGTCACTGGGGGACTT-3'
	Exon 2-5	Conventional PCR	FW: 5'-GACCTCCATGCCTTTGAGAA-3' RV: 5'-TTCTCCACAACTCCCTTGG-3'
	Exon 12-13	Conventional PCR	FW: 5'-GCAACAGAGGTGAAAACAG-3' RV: 5'-TTCGCATGAAGAGGCCGATC-3'
	<i>EGFRvII</i>	Conventional PCR	FW: 5'-GTGGACAAGTGCAACCTTCTG-3' RV: 5'-GTCTTGAAGGCTGTCCAACGA-3' TQ: 5'-GAGGGATGCACTGGG-3'
		TaqMan® RQ-PCR	FW: 5'-GAGGGATGCACTGGG-3'
	<i>EGFRvIV</i>	Conventional PCR	FW: 5'-GGGAGTTGATGACCTTTGGA-3' RV: 5'-AGCTTTGCAGCCCATTCTA-3' FW: 5'-CAGCGCTACCTTGTCAATCA-3' RV: 5'-TAATTGGTGGCTGCCTTTC-3'
		TaqMan® RQ-PCR	FW: 5'-GTGAGTTGATCATCGAATTCTCCAAAA-3' RV: 5'-AAAGGCCCGCTGGCT-3' TQ: 5'-TGTATTCTGAATGACAAGGT-3'
		TaqMan® RQ-PCR	Hs00193306_m1
<i>CDK4</i>	Exon 7-8	TaqMan® RQ-PCR	Hs00364847_m1
<i>MDM4</i>	Exon 9-10	TaqMan® RQ-PCR	Hs00967245_m1
<i>PDGFRA</i>	Exon 15-16	TaqMan® RQ-PCR	Hs00998018_m1
	Exon 8-9	TaqMan® RQ-PCR	FW: 5'-GAGATCACCACTGATGTGGAAAAGA-3' RV: 5'-AAACTTCCTGGACTATTTGGCCA-3' TQ: 5'-CATTATTACATCTTATTTCTG-3'
<i>TBP</i>	Exon 2-3	TaqMan® RQ-PCR	Hs00427620_m1
<i>GAPDH</i>	Exon 2	TaqMan® RQ-PCR	Hs99999905_m1

FW: forward primer; RV: reverse primer; TQ: TaqMan probe; RQ-PCR: real-time polymerase chain reaction; NA: not appropriate.

Supplementary Table 3. GBM tumors displaying *EGFR* amplification and *EGFRvIII* (n=38) deletion and other intragenic deletions of the *EGFR* gene coexisting in the same tumor.

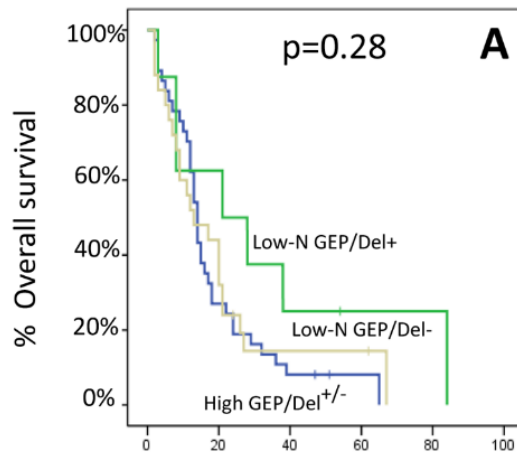
Sample ID	<i>EGFR</i> amplification status	Chr7 Status	<i>EGFRvIII</i>				Other intragenic deletions	
			SYBR™Green	Sequencing	TaqMan® Ct/Assay	Conventional PCR/ sequencing	TaqMan®	
vIII_1	AMP	diploid	+	S	17.92	+		
vIII_2	AMP	diploid	+	S	25.31	-		
vIII_3	AMP	diploid	+	S	25.50	-		
vIII_4	AMP	diploid	NS	NS	19.33	+		
vIII_5	AMP	trisomy	+	S	12.15	+	del exon 25	
vIII_6	AMP	trisomy	+	S	13.62	+	<i>EGFRvII</i>	<i>EGFRvII</i>
vIII_7	AMP	trisomy	+	S	14.19	+		
vIII_8	AMP	trisomy	+	S	14.27	+	<i>EGFRvIVa</i>	<i>EGFRvIVa</i>
vIII_9	AMP	trisomy	+	S	14.67	+		
vIII_10	AMP	trisomy	+	S	14.71	+		
vIII_11	AMP	trisomy	+	S	15.15	+		
vIII_12	AMP	trisomy	+	S	16.73	+		
vIII_13	AMP	trisomy	+	S	17.23	+		
vIII_14	AMP	trisomy	+	S	18.95	+		
vIII_15	AMP	trisomy	+	S	23.85	+		
vIII_16	AMP	trisomy	+	S	26.35	-		
vIII_17	AMP	trisomy	+	S	27.10	-		
vIII_18	AMP	trisomy	+	S	25.43	-		
vIII_19	AMP	polysomy	+	S	14.40	+	del exons 2-5 <i>EGFRvII</i>	<i>EGFRvII</i> <i>EGFRvIVa</i>
vIII_20	AMP	polysomy	+	S	13.08	+		
vIII_21	AMP	polysomy	+	S	18.55	+		
vIII_22	AMP	polysomy	+	S	24.69	+		
vIII_23	AMP	polysomy	+	S	25.19	-		
vIII_24	AMP	polysomy	+	S	25.55	-		
vIII_25	AMP	polysomy	+	S	-	-		
vIII_26	not AMP	diploid	+	S	25.84	-		
vIII_27	not AMP	trisomy	+	S	18.07	+		
vIII_28	not AMP	trisomy	+	S	19.75	+		
vIII_29	not AMP	trisomy	+	S	20.50	+		
vIII_30	not AMP	trisomy	+	S	21.05	+		
vIII_31	not AMP	trisomy	+	S	22.69	+		
vIII_32	not AMP	trisomy	+	S	25.72	-		
vIII_33	not AMP	polysomy	+	S	25.76	-	del exons 8-28 ^s	
vIII_34	not AMP	polysomy	+	S	12.44	+		
vIII_35	not AMP	polysomy	+	S	17.64	+		
vIII_36	not AMP	polysomy	+	S	26.06	-		
vIII_37	not AMP	polysomy	+	S	-	-		
vIII_38	not AMP	polysomy	-	NS	24.64	+		

Cut-off Ct value for (TaqMan®) detection of *EGFRvIII* was of 24.93 (median+2SD Ct value for normal brain tissue of 25.92±0.99). Ct: Threshold cycle; S: Sequenced; NS: Not sequenced; +: *EGFRvIII* detected; -: *EGFRvIII* not detected; del: deletion; [§]: Possible deletion after exon 8 extending until the end of the *EGFR* gene.

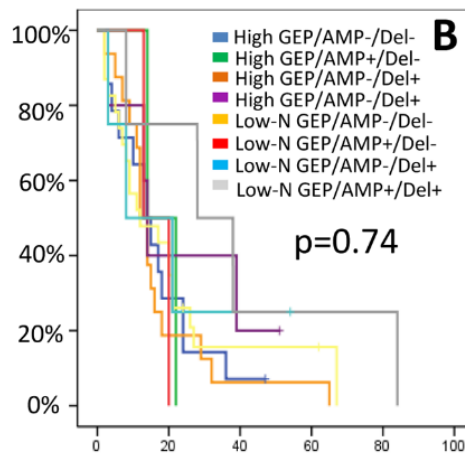
Supplementary Table 4. Relationship between *EGFR*, *CDK4*, *MDM4* and *PDGFRA* gene expression profiles and the clinical features of the disease at diagnosis.

Clinical variables		Gene expression values							
		% <i>EGFR</i> overexpression		% <i>CDK4</i> overexpression		% <i>MDM4</i> overexpression		% <i>PDGFRA</i> overexpression	
		<i>p</i> -value		<i>p</i> -value		<i>p</i> -value		<i>p</i> -value	
Gender	Female (n=33)	58%		94%		48%		70%	
	Male (n=50)	58%	1	88%	0.4	34%	0.3	50%	0.1
Age (range in years)	18-45 (n=16)	69%		94%		25%		56%	
	46-65 (n=29)	62%	0.4	93%	0.6	41%	0.4	62%	0.8
	66-85 (n=38)	50%		87%		45%		55%	
Tumor location	Frontal (n=27)	63%		89%		37%		66%	
	Temporal (n=28)	57%		93%		32%		50%	
	Parietal (n=5)	40%		60%		60%		60%	
	Occipital (n=6)	66%	0.8	100%	0.4	50%	0.7	50%	0.8
	Fronto-temporal (n=3)	66%		100%		0%		66%	
	Fronto-parietal (n=2)	100%		100%		50%		100%	
	Temporo-parietal (n=3)	66%		100%		33%		66%	
	Deep (n=1)	0%		100%		100%		100%	
Karnofsky index	<50 (n=12)	66%		100%		42%		66%	
	60-70 (n=25)	44%	0.3	88%	0.2	20%	0.1	56%	0.9
	80-90 (n=31)	68%		94%		52%		61%	
	100 (n=7)	71%		71%		29%		57%	

Supplementary Figure 1



Low-N GEP/Del+	25	11	3	3	0	0
Low-N GEP/Del-	8	5	2	2	1	0
High GEP/Del ^{+/-}	37	10	3	1	0	0



High GEP/AMP-/Del-	14	4	1	0	0	0
High GEP/AMP+/Del-	2	1	0	0	0	0
High GEP/AMP+/Del+	16	3	1	0	0	0
High GEP/AMP-/Del+	5	2	1	0	0	0
Low-N GEP/AMP-/Del-	23	9	3	3	0	0
Low-N GEP/AMP+/Del-	2	1	0	0	0	0
Low-N GEP/AMP-/Del+	4	2	1	0	0	0
Low-N GEP/AMP+/Del+	4	3	1	1	1	0

Figure S1: Prognostic impact of the GEP of *EGFR* on overall survival of GBM patients distributed according to the pattern of intragenic *EGFR* deletions and gene expression levels (panel A), and the *EGFR* amplification status (panel B).

Artículo 3: “Los perfiles de células tumorales y células inmunes en el glioblastoma humano primario: impacto en la evolución clínica del paciente”

María González-Tablas^{1,2}, Álvaro Otero MD^{1,3}, Daniel Arandia MD^{1,3}, Daniel Pascual MD^{1,3}, Laura Ruiz MD^{1,3}, Pablo Sousa MD^{1,3}, Andoni García MD^{1,3}, Juan Carlos Roa MD^{1,3}, Jorge Javier MD Villaseñor MD^{1,3}, Luis Torres MD^{1,3}, Maria do Rosário Almeida PhD⁴, Javier Pedro Ortiz MD^{1,5}, Adelaida Nieto MD^{1,6}, Alberto Orfao MD, PhD^{1,2,7}*, María Dolores Taberner MD, PhD^{1,2,7}*

¹ Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, IBSAL- Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España; ² Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL-IBSAL), Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España; ³ Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario, España; ⁴ Centro de Neurociencias y Biología celular, Universidad de Coimbra, Portugal; ⁵ Servicio de Patología del Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España; ⁶ Servicio de Radioterapia del Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España; ⁷ Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto Carlos III, Madrid, España; *Ambos autores han contribuido de manera equitativa en este trabajo y deben ser considerados como último autor.

Brain Pathology

DOI: 10.1111/bpa.12927

Introducción: En las últimas décadas, se ha avanzado de forma significativa en el conocimiento detallado de las características histopatológicas y genéticas de las células tumorales del GB, demostrándose que se trata de un tumor muy heterogéneo. En gran medida, dicha heterogeneidad está relacionada con distintos perfiles citogenéticos y genómicos, pero también con la existencia de perfiles de interacción muy variables entre las células tumorales y su microambiente inmune, y en particular con las células inmunes que infiltran el tumor. En la actualidad, la distribución y el papel que tienen estas células inmunes presentes en el tejido tumoral de los GB siguen siendo, en gran medida, desconocidos.

Objetivos: En este trabajo nos propusimos investigar, mediante citometría de flujo, la composición celular de muestras tumorales de GB primario de pacientes adultos y correlacionar el perfil inmune del tumor con las características clínicas del paciente en el momento del diagnóstico y la evolución posterior de la enfermedad.

Material y métodos: Para lograr nuestro objetivo analizamos muestras de tejido tumoral de GB obtenidas del paciente en el momento del diagnóstico (n=44) y en la recidiva tras radioterapia y/o quimioterapia (n=11). En las suspensiones unicelulares obtenidas a partir de cada tumor, analizamos un amplio panel de marcadores (anticuerpos monoclonales) combinados para la identificación y recuento, mediante lectura en un citómetro de flujo equipado con 5 láseres, de las células presentes en el tumor, incluyendo: células tumorales, células astrocíticas normales (GFAP⁺CD45⁻), células mieloides infiltrantes –TAM, tanto de microglía como derivados de la sangre, distinguiendo entre células de tipo M1 y M2, granulocitos neutrófilos y MDSC– y
















linfocitos, células TCD3⁺, y sus subpoblaciones TCD4⁺, TCD8⁺, TCD4⁻CD8⁻ y Tregs (CD25⁺ CD127^{lo}), células B (CD19⁺ CD20⁺) y células NK (CD16⁺).

Resultados: Globalmente, en las muestras de los GB analizados, observamos una población mayoritaria de células tumorales y astrocíticas normales (media \pm 1 desviación estándar de 73% \pm 16%), junto con una proporción significativa, aunque muy variable, de células inmunes (24% \pm 18%). Dentro de las células mieloides, predominaron los TAM (13% \pm 12%), incluyendo tanto células microgliales (10% \pm 11%) como macrófagos derivados de sangre (3% \pm 5%), además de una pequeña proporción de granulocitos neutrófilos (5% \pm 9%) y MDSC (4% \pm 8%). Los linfocitos estaban poco representados y, en su mayoría, incluían células TCD4⁺ (0,5% \pm 0,7%) y células TCD8⁺ (0,6% \pm 0,7%), junto con un pequeño número de células TCD4⁻CD8⁻ (0,2% \pm 0,4%), Tregs (0,1% \pm 0,2%), linfocitos B (0,1% \pm 0,2%) y células NK (0,05% \pm 0,05%). En conjunto, se identificaron tres perfiles inmunes distintos, que permitían agrupar a los GB en: i) casos con un pequeño infiltrado leucocitario, ii) tumores con predominio de TAM y neutrófilos, y iii) casos con infiltración mixta de TAM, neutrófilos y linfocitos T. El grupo de pacientes con GB (excluyendo aquellos casos recurrentes y, por tanto, los pacientes ya tratados), que presentaron infiltrados inmunes mixtos (mieloides y linfoides), mostró una supervivencia global significativamente más corta que los otros dos grupos, en ausencia de ganancias del gen *EGFR* (*p*-valor = 0,02).

Conclusiones: Nuestros resultados demuestran la presencia sistémica de infiltrados de células inmunes en el tejido tumoral de los GB, con niveles globales y perfiles inmunes muy variables. Los pacientes con GB con infiltrados mixtos de células mieloides y de linfocitos T mostraron un peor pronóstico respecto a los demás pacientes.

RESEARCH ARTICLE

Tumor cell and immune cell profiles in primary human glioblastoma: Impact on patient outcome

María González-Tablas Pimenta^{1,2}  | Álvaro Otero^{1,3}  | Daniel Angel Arandia Guzman^{1,3}  | Daniel Pascual-Argente^{1,3}  | Laura Ruíz Martín^{1,3}  | Pablo Sousa-Casasnovas^{1,3}  | Andoni García-Martin^{1,3}  | Juan Carlos Roa Montes de Oca^{1,3}  | Javier Villaseñor-Ledezma^{1,3}  | Luis Torres Carretero^{1,3}  | Maria Almeida⁴  | Javier Ortiz^{1,5}  | Adelaida Nieto^{1,6}  | Alberto Orfao^{1,2,7}  | María Dolores Tabertero^{1,2,7} 

¹Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, IBSAL—University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

²Centre for Cancer Research (CIC-IBMCC; CSIC/USAL; IBSAL), Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

³Neurosurgery Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁴Centre for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁵Pathology Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁶Radiotherapy Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁷Biomedical Research Networking Centre on Cancer—CIBERONC (CB16/12/00400), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

Correspondence

María Dolores Tabertero, Laboratorio de Secuenciación, Planta Baja, Edificio I+D+i, C/Espejo n°2, Salamanca, Spain. Email: taberner@usal.es

Funding information

Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain and fondos FEDER, Grant/Award Number: CB16/12/00400 and ISCIII PI16/0476; Consejería de Sanidad Junta de Castilla y León, Gerencia Regional de Salud, Spain, Grant/Award Number: GRS2049/A/19

Abstract

The distribution and role of tumor-infiltrating leucocytes in glioblastoma (GBM) remain largely unknown. Here, we investigated the cellular composition of 55 primary (adult) GBM samples by flow cytometry and correlated the tumor immune profile with patient features at diagnosis and outcome. GBM single-cell suspensions were stained at diagnosis (n = 44) and recurrence following radiotherapy and chemotherapy (n = 11) with a panel of 8-color monoclonal antibody combinations for the identification and enumeration of (GFAP⁺CD45⁻) tumor and normal astrocytic cells, infiltrating myeloid cells—i.e. microglial and blood-derived tumor-associated macrophages (TAM), M1-like, and M2-like TAM, neutrophils, and myeloid-derived suppressor cells (MDSC)—and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL)—i.e. CD3⁺T-cells and their TCD4⁺, TCD8⁺, TCD4⁻CD8⁻, and (CD25⁺CD127^{lo}) regulatory (T-regs) subsets, (CD19⁺CD20⁺) B-cells, and (CD16⁺) NK-cells—. Overall, GBM samples consisted of a major population (mean ± 1SD) of tumor and normal astrocytic cells (73% ± 16%) together with a significant but variable fraction of immune cells (24% ± 18%). Within myeloid cells, TAM predominated (13% ± 12%) including both microglial cells (10% ± 11%) and blood-derived macrophages (3% ± 5%), in addition to a smaller proportion of neutrophils (5% ± 9%) and MDSC (4% ± 8%). Lymphocytes were less represented and mostly included TCD4⁺ (0.5% ± 0.7%) and TCD8⁺ cells (0.6% ± 0.7%), together with lower numbers of TCD4⁻CD8⁻ T-cells (0.2% ± 0.4%), T-regs (0.1% ± 0.2%), B-lymphocytes (0.1% ± 0.2%) and NK-cells (0.05% ± 0.05%). Overall, three distinct immune profiles were identified: cases with a minor fraction of leucocytes, tumors with a predominance of TAM and neutrophils, and cases with mixed infiltration by

Alberto Orfao and María Dolores Tabertero have equally contributed to this manuscript and both should be considered as the last author.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2020 The Authors. *Brain Pathology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of International Society of Neuropathology

TAM, neutrophils, and T-lymphocytes. Untreated GBM patients with mixed myeloid and lymphoid immune infiltrates showed a significantly shorter patient overall survival versus the other two groups, in the absence of gains of the *EGFR* gene ($p = 0.02$). Here we show that immune cell infiltrates are systematically present in GBM, with highly variable levels and immune profiles. Patients with mixed myeloid and T-lymphoid infiltrates showed a worse outcome.

KEY WORDS

glioblastoma, immune cells, lymphocytes, microenvironment, microglia, myeloid cells

1 | INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent and lethal malignant brain tumor type with a median overall survival rate of ≈ 1 year (y) (1). In past decades, detailed knowledge has been achieved about the (e.g., histopathological and genetic/molecular) characteristics of GBM cells (2). These studies also confirmed GBM displays highly heterogeneous molecular profiles (3). To a large extent, such heterogeneity is related to distinct tumor-associated cytogenetic and genomic profiles (4), but also to highly variable interactions between the tumor cells and their microenvironment, particularly with tumor-infiltrating leucocytes (5).

At present, it is well-established that both the innate and adaptive immune systems play a critical role in immune surveillance (6). At the earlier phases of tumor development, neoplastic cells might trigger inflammatory responses with local infiltration by innate immune cells, such as macrophages and other antigen-presenting cells (APC), as well as NK-cells (7). Tumor antigens presented by local APC and the tumor cells themselves might further activate local tumor cell-specific cytotoxic T-cell and humoral B-cell responses, aimed at controlling tumor development and growth (8). However, the GBM tumor microenvironment progressively becomes immunosuppressive, leading to immune tolerance, tumor growth, and progression (9,10). Thus, GBM cells display impaired presentation of tumor antigens with decreased expression of HLA molecules, and they produce and release immunosuppressive and pro-apoptotic signals to the infiltrating tumor-specific immune cells (11–13), such as transforming growth factor beta (TGF- β) and interleukin (IL)-10 (14). Locally produced TGF- β inhibits T-cell activation, proliferation, and differentiation, while promoting regulatory T-cells (T-regs) and suppressing both NK-cell and T-cell cytotoxicity, as well as innate cell functions, thereby contributing also to immune escape and tumor growth (15). In turn, locally produced IL-10 (16) exerts inhibitory effects on T-helper (Th) cells, monocytes, macrophages, and dendritic cells (DC) (17). Altogether, this leads to an impaired balance between anti-tumor immune responses and immune tolerance that progressively favors tumor

development and growth (18), in which local infiltrating macrophages, T-regs, and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) might play a critical role (3).

At present, it is well established that tumor-infiltrating leucocytes consist of an admixture of several immune cells at variable proportions, such as tumor-associated macrophages (TAM) and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL). TAM present in GBM might derive from two independent sources: brain-resident microglia cells and bone marrow (BM) or blood-derived monocytes/macrophages (5). Both types of TAM interact with tumor cells and might promote the growth and progression of GBM (19) due to an imbalanced ratio between pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) macrophages (20). In turn, locally increased T-regs and MDSC have also been found in GBM in association with tumor progression, poor response to immunotherapy and more adverse patient outcome (21–24). Of note, MDSC have been reported to be increased both inside the tumor and in blood of GBM patients (22).

Despite the potential relevance of immune surveillance versus immune tolerance in GBM, detailed information about the composition of immune cell infiltrates in GBM still remains relatively limited (3,25,26). This is partially due to technical limitations as regards the number of markers and cell populations that have been simultaneously detected (with both immunochemistry and flow cytometry) in otherwise limited (i.e., small) tumor samples (21,27–29). Recent development and availability of flow cytometers capable of simultaneously evaluating higher numbers of markers and immune cell populations (30), paves the way for more detailed characterization of the distinct immune cell populations present in both tumor and blood specimens of GBM patients, at the expense of losing information about their spatial tissue location.

Here we used an 8-color panel of antibody combinations for simultaneous (detailed) characterization of GBM tumor cells and tumor-infiltrating immune cells by flow cytometry. Our goal was to gain insight into the cellular composition of the tumor microenvironment in GBM and to investigate in a pilot series of 55 tumor samples (44 primary diagnostic samples and 11 recurrent tumors studied after therapy) from 51 patients its potential association with disease features at diagnosis and patient outcome.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Patients and samples

A total of 55 GBM (tumor) samples from 51 adult patients—22 females and 29 males; mean age of 60 years, ranging from 27 to 80 years—who underwent surgery at diagnosis ($n = 43$ patients; 44 samples) or at tumor progression/recurrence ($n = 8$ patients; 11 samples) at the Neurosurgery Service of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain), were studied (Table S1). In 3/51 patients, paired samples obtained at diagnosis, (including two samples from a bilateral tumor in which complete in block tumor resection was not achieved) and at tumor progression/recurrence were analyzed in parallel. Only those parts of the tumor showing both macroscopical and microscopical infiltration were used for immune cell analyses, avoiding necrotic areas and areas with the heterogeneous spatial distribution of cell populations. GBM diagnosis was made by an experienced pathologist based on WHO criteria, including immunohistochemical labeling for the IDH1 mutated protein, ATRX, GFAP, EGFR, TP53 or KI-67 among other markers. In a subset of 10 GBM samples, further immunohistochemical analyses were performed in order to better identify and characterize residual non-tumor cells and the immune cell infiltrates. All tissue samples used in this study were obtained after informed consent had been given by each individual patient, and the study was approved by the local ethics committee of the University Hospital of Salamanca. In 44 GBM patients (34 newly diagnosed patients and 10 recurrent tumors), peripheral blood samples were also obtained prior to surgery for the parallel evaluation of the distribution of the major subsets of leucocytes and lymphocytes.

2.2 | Mutational analyses

Analysis of *IDH1* and *IDH2* gene mutations was based on DNA extracted from frozen tissue samples ($n = 46$) using organic solvents and subsequent digestion with Proteinase K, according to well-established methods (31). Exon 4 DNA of both the *IDH1* and the *IDH2* genes was amplified by PCR and sequenced on a capillary automated sequencer (CEQ 8000; Beckman-Coulter, Hialeah, FL); mutational analysis of the sequenced data was performed using the Sequencher, (version 4.7) software (Genes Codes, Ann Arbor, MI). Only 1/46 primary GBM cases analyzed showed *IDH1* mutation (Table S2).

2.3 | Immunophenotypic studies

Each tumor sample was stained with a 5-tube 8-color antibody panel that systematically contained the DRAQ5

live nucleated cell DNA dye (Cytognos, SL, Salamanca, Spain) for staining and identification of (all) nucleated cells and to evaluate their baseline autofluorescence levels (Table S3). Stainings were evaluated in either an LSRFortessa X20 or a FACSCanto II flow cytometer—Becton/Dickinson Biosciences (BD), San Jose, CA—for the following markers: CD45, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD24, CD25, CD33, CD44, CD56, CD68, CD127, CD133, CD163, CD192, CD206, EGFR, GFAP, HLA-DR, IL-10, SOX2, and TGF- β (Table S3).

Briefly, fresh GBM samples were placed in 1 ml of RPMI 1640 medium (Gibco™, Life Technologies, Grand Island, NY) and mechanically disaggregated with tweezers, as previously described (32). The resulting single-cell suspension was placed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 2 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), 0.09% azide, 0.5% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco™). After a short (5 min) sedimentation step, the supernatant was collected and the cell suspension passed through a 20-25G gauge needle, centrifuged (10 min at 314 G), the supernatant removed and the cell pellet washed in PBS. Afterward, staining for cell surface membrane markers was performed by incubating $\geq 1 \times 10^6$ cells/aliquot with the corresponding monoclonal antibody combination for 30 min in the dark (room temperature, RT). In case of aliquots stained only for cell surface membrane markers, stained cells were subsequently washed in PBS, resuspended in 2ml of 1X FACS Lysing Solution—10X FACS Lysing Solution (BD Biosciences) diluted 1/10 (vol/vol) in distilled water—, incubated for another 15 min (RT) in the dark, washed in PBS and resuspended in 0.5 mL of PBS. In turn, for combined staining of cell surface plus cytoplasmic markers (i.e., GFAP, CD68, and SOX2), the Fix&Perm™ reagent (Nordic-MUbio, Rangeerweg, The Netherlands) was used, following previously described protocols (33). Briefly, after staining for cell surface markers as described above, cells were sequentially washed in PBS, incubated for 15 min in the dark (RT) with 50 μ l of solution A (fixative) of Fix&Perm™ and washed in PBS; monoclonal antibodies against cytoplasmic markers were then added together with 50 μ l of solution B (permeability solution) of the Fix&Perm™ reagent, and stained cells were subsequently incubated for another 15 min in the dark (RT), washed, resuspended in 0.5 ml of PBS and measured in the flow cytometer, as described below. Immediately, prior to data acquisition, the DRAQ5 DNA dye was added, as described elsewhere (34).

Peripheral blood samples were stained with a 12-marker, 8-color, combination of monoclonal antibodies strictly following the EuroFlow standard operating procedures (SOPs) previously reported in detail (35) and that are available at Euroflow.org.

2.4 | Detection of cytokine production by GBM tumor cells

Spontaneous production of both TGF- β and IL-10 was evaluated after short term (1 h) *in vitro* culture (37°C) of tumor cells in RPMI 1640 medium to which 0.2% brefeldin A (Sigma-Aldrich) per 100 μ l volume had been added. Cultured cells were then stained for cell surface membrane markers (CD45, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD25, CD127, CD192, CD206, and HLA-DR) and intracellular TGF- β -PECF594 and IL10-PE, as described above (i.e., tubes 1 and 3 in Table S3). Prior to data acquisition in the flow cytometer, the DRAQ5 DNA dye was added to stain (all) nucleated cells.

2.5 | Flow cytometry data acquisition and analysis

The FACSDiva™ software (BD Biosciences) was used for the acquisition of data on $\geq 10^6$ events/tube. For data analysis, the Infinicyt software (Cytognos, SL) was employed. During data analysis, the percent distribution of each cell population in the sample together with its phenotype—percent of positive cells and mean fluorescence intensity (MFI) per marker—were recorded. The small fraction of residual normal astrocytic cells in the tumor tissue specimens (non-tumoral non-hematopoietic tissue cells) could not be clear cut identified and discriminated from the GBM cells coexisting in the same sample; thereby, they were systematically included within the percentage of non-hematopoietic (tumor) cells.

2.6 | Cell purification and characterization of FACS-sorted cells

Purification of two different cell populations coexisting in all GBM samples was performed in a subset of 20 fresh tumor samples, using a 4-way fluorescence-activated cell sorter (FACSARIA III; BD Biosciences) and the FACSDiva software. Prior to sorting, cells were re-suspended in PBS containing 2 mM EDTA, 0.09% azide, 0.5% BSA, and 10% FBS, and stained with a 4-color antibody combination (CD45-PacB HLA-DR-PB CD11b-FITC CD14-PE) to which the DRAQ5 DNA dye was added, as previously described (36). The phenotype of the distinct purified (DRAQ5^{hi}) nucleated cell populations was as follows: (i) CD45⁺ CD11b⁺ HLADR⁺ CD14⁺ macrophages and (ii) CD45⁻ CD11b⁻ HLADR⁻ CD14⁻ GBM cells, with a mean (\pm 1SD) purity of 99% \pm 0.4% and 99% \pm 4%, respectively. A fraction of the sorted cells was concentrated and placed on a cytospin slide to assess their morphological appearance based on hematoxylin and eosin staining, analyzed in an Olympus BX5 microscope (Olympus, Melville, NY).

2.7 | Interphase fluorescence *in situ* hybridization studies (iFISH)

iFISH studies were performed in whole GBM single-cell suspensions of tumor samples obtained by mechanical disaggregation procedures as described above, after they had been fixed in methanol/acetic acid (3:1 v/v). For iFISH studies, the EGFR/CEP7 FISH probe Kit from Vysis Abbott Molecular Inc (Des Plaines, IL) was used. *EGFR* gene amplification was defined when ≥ 7 fluorescent signals (i.e., spots) were present for its specific probe; below this cut-off, tumors with ≥ 3 copies of the *EGFR* gene (3–6 fluorescence signals) were considered to have genetic/chromosome gains.

2.8 | Statistical analyses

For all statistical analyses, the SPSS software (SPSS 25.0, IBM SPSS, Armonk, NY) was used. The Student T, the Mann-Whitney U, and the Chi-square tests were used to compare different groups of patients for (parametric and non-parametric) continuous parameters and for categorical variables, respectively. Unsupervised clustering based on t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) was used for the classification of GBM samples based on their immune cell composition (37). Survival curves were plotted according to the Kaplan and Meier method, and the (two-sided) log-rank test was used to assess the statistical significance of differences in overall survival (OS) between distinct groups of patients. For OS studies, only those GBM studied at diagnosis, who survived for >1 month after surgery and had a minimum follow-up of 18 months (in case of patients remaining alive), were included in the analysis.

3 | RESULTS

3.1 | Identification of tumor cell and immune cell populations in GBM samples

Gating of flow cytometric data for accurate phenotypic identification of the distinct cell populations coexisting in GBM tumor samples was based on the phenotypic profiles described in Table 1, as illustrated in Figure 1. Briefly, nucleated cells were first gated based on their high DRAQ5-associated fluorescence intensity, after excluding cell debris and doublets based in a forward high scatter-area (FSC-A) versus FSC-Height (FSC-H) dot plot histogram (Figure 1A). Subsequently, GBM tumor cells and normal residual astrocytic cells were identified as GFAP⁺ CD45⁻ cells and subdivided into two SOX2⁻ and SOX2⁺ cell populations (Figure 1A). In turn, tumor-infiltrating leucocytes were defined as GFAP⁻ CD45⁺ cells and microglial cells as CD45^{low} HLADR⁺ CD14⁺ cells with high green autofluorescence levels (Figure 1A,B; Table 1). Blood-derived tumor-infiltrating monocytes/

TABLE 1 Phenotypic features used for the identification of GBM tumor cells, microglial cells, and other infiltrating immune cell populations present in GBM tissue specimens (n = 55)

Immunophenotypic marker	Cell population																																						
	Mature GBM tumor cells		Immature tumor cells		Immune cells		Myeloid cells		Microglial cells		Blood-derived macrophages		M1-like TAM		M2-like TAM		MDSC		Neutrophils		Lymphocytes		T-cells		CD4 ⁺ CD8 ⁻ T-cells		CD4 ⁺ CD8 ⁻ T-cells		CD4 ⁺ T-regs		B-cells		NK-cells						
	Het	-	Het	-	Het	-/+	Het	-	Het	-	Het	-	Het	-/+	Het	-	Het	-/+	Het	-	Het	-	Het	-	Het	-	Het	-	Het	-	Het	-	Het	-	Het	-	Het	-	
SSC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GAFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CD45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GFAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOX2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD11b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD19-CD20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HLA-DR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD192	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
CD206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: Other markers evaluated in tumor cells were EGFR (growth factor receptor), CD24 and CD44 (adhesion markers), and CD192 (chemokine receptor). Some of these markers were also used for the identification and/or characterization of neutrophils (CD44, CD24), and lymphocytes (CD44), and CD68 was used to identify TAM.

Abbreviations: -, marker not expressed; +, marker expressed; -/+, marker expressed in a fraction of the cell population; GAFI: Green autofluorescence; TAM: Tumor-associated macrophages.

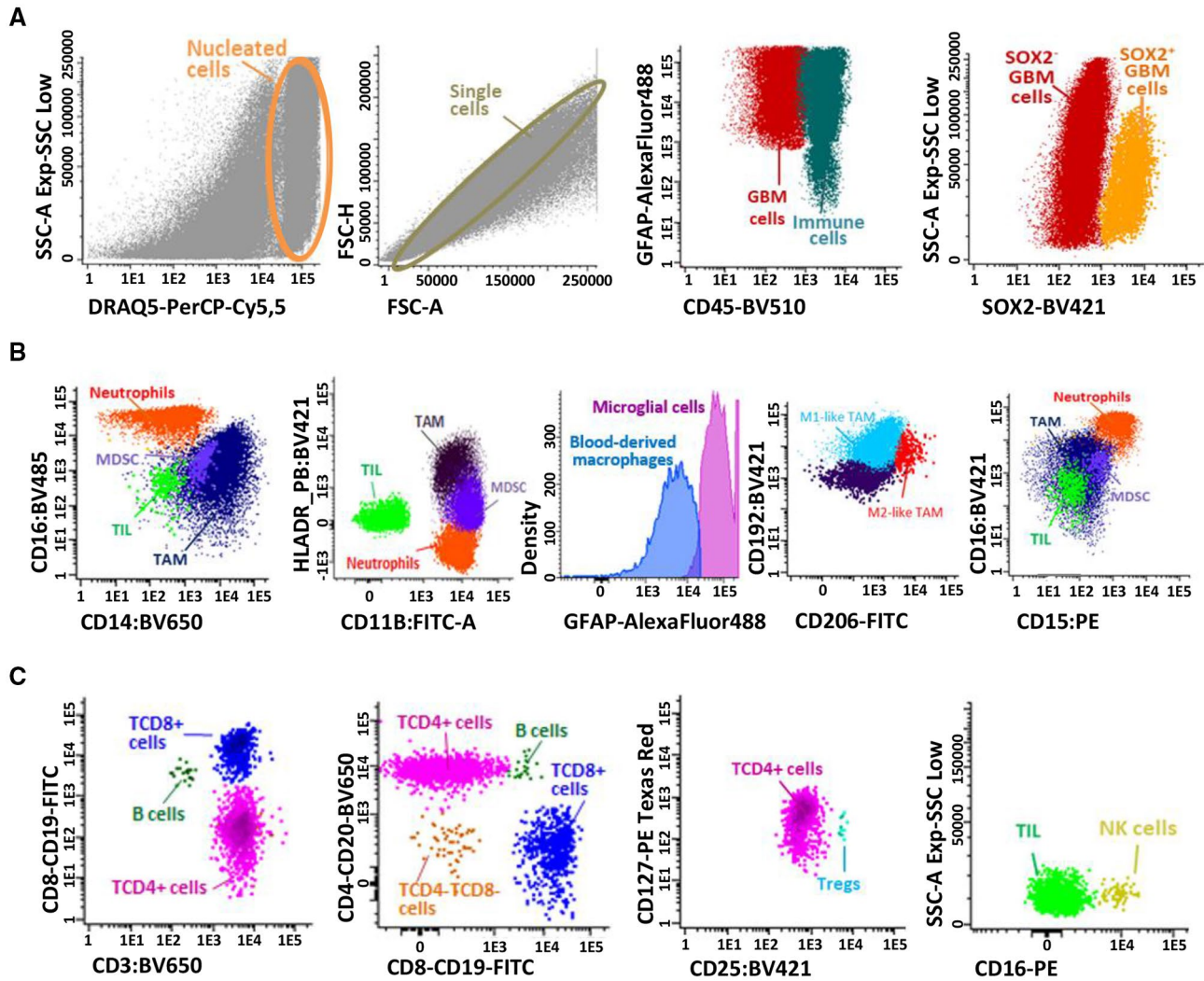


FIGURE 1 Immunophenotypic identification and characterization of distinct cell populations present in single-cell suspensions derived from fresh GBM tumor samples identified based on 8-color flow cytometry stainings. First, live cells stained with DRAQ5 were selected, doublets eliminated, and nucleated cells corresponding to immune and GBM tumor (and normal astrocytic) cells were evaluated according to CD45 and GFAP expression profile. GBM tumor and normal astrocytic cells stained with GFAP subdivided into mature and immature GBM cells based on the staining for SOX2 (panel A). Second, myeloid and lymphoid populations were distributed based on the stained for CD14, CD16, CD11b, and HLA-DR markers (panel B). TAM population (CD11b⁺HLA-DR⁺CD14⁺) was subsetted into microglial cells (CD45⁺ high green autofluorescence) and blood-derived monocytes/macrophages (CD45⁺ low green autofluorescence). Two subsets of TAM were subsequently defined (M1 and M2-like TAM) according to the pattern of expression of CD206 and CD192. Other tumor-infiltrating leucocytes (CD45⁺ GFAP⁻CD14⁻) were defined also as CD11b⁺ myeloid cells; neutrophils were also CD11b⁺ but in addition they showed a CD15^{hi}CD16^{hi}HLA-DR⁻ phenotype, while MDSC were HLA-DR⁻CD16⁻ with variable expression levels of CD14 and CD15 (Panel B). Among CD45^{hi} lymphocytes, T-cells were identified as CD3⁺ cells and they included TCD4 (CD4⁺CD8⁻), T CD8 (CD4⁻CD8⁺), T double-negative (DN; CD4⁻CD8⁻) T-cells, together with CD4⁺ T-regs (CD25^{high}CD127^{low}); B-cells were defined as CD20⁺CD19⁺CD3⁻ lymphocytes and NK-cells were identified based on high CD16⁺ expression in the absence of CD3 and CD19 (panel C) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

macrophages were CD45⁺GFAP⁻ with low green autofluorescence (Figure 1B). In turn, TAM were discriminated from other immune infiltrating cells, particularly from other myeloid cells, based on their strong co-expression of CD11b⁺ and HLA-DR⁺ and their positivity for CD14⁺ (Figure 1C; Table 1). TAM (both microglial cells and blood-derived monocytes/macrophages) were further divided into HLA-DR⁺CD14⁺CD192⁺ M1-like versus HLA-DR⁺CD14⁺CD163⁺ and/or CD206⁺ M2-like cells (Figure 1C and Table 1). Further identification of neutrophils (SSC^{hi}) among myeloid infiltrating cells was based on their unique CD15^{hi} and CD16^{hi} (or CD24^{hi}) phenotype, in

the absence of CD14 and HLA-DR expression (Figure 1C and Table 1). MDSC were gated as CD11b⁺HLA-DR⁻CD33^{low}CD45^{low}GFAP⁻ myeloid cells that showed variable levels of expression of both CD14 and CD15 (Figure 1C and Table 1). Finally, tumor-infiltrating SSC^{lo}CD45^{hi} lymphocytes were subdivided into CD3⁺ T-cells, CD19⁺CD20⁺ B-cells and CD3⁻CD19⁻CD16⁺ NK-cells (Figure 1D and Table 1); T-cells were further subsetted into TCD4⁺ (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), TCD8⁺ (CD3⁺CD4⁻CD8⁺) and T-double negative (DN) (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) T-lymphocytes, in addition to CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} T-regs (Figure 1D; Table 1).

TABLE 2 Distribution of distinct populations of tumor cells, TAM (microglial cells and blood-derived macrophages), and other tumor-infiltrating immune cells in GBM samples (n = 55)

Cell population and phenotype	Marker	% cells in the tumor sample	% cells within the parental population
Total GBM tumor cells (GFAP ⁺)		73% ± 16%	
SOX2 ⁻ GBM tumor cells (CD45 ⁻ GFAP ⁺ SOX2 ⁻)		52% ± 25%	
	EGFR ⁺	9% ± 13%	14% ± 26%
	CD24 ⁺	16% ± 22%	24% ± 32%
	CD44 ⁺	41% ± 30%	61% ± 34%
	CD192 ⁺	13% ± 11%	27% ± 26%
SOX2 ⁺ GBM tumor cells (CD45 ⁻ GFAP ⁺ SOX2 ⁺)		20% ± 26%	
	CD133 ⁺	8% ± 10%	48% ± 41%
Immune cells (CD45 ⁺)		24% ± 18%	
Myeloid cells		22% ± 17%	90% ± 15%
TAM (HLA-DR ⁺ CD14 ⁺)		13% ± 12%	61% ± 28%
M1-like TAM (CD192 ⁺)		4% ± 6%	17% ± 18%
M2-like TAM (CD163 ⁺)		3% ± 6%	16% ± 20%
	CD206 ⁺	2% ± 3%	12% ± 20%
CD33 ⁺		13% ± 13%	45% ± 29%
CD16 ⁺		4% ± 8%	16% ± 20%
CD44 ⁺		8% ± 8%	35% ± 30%
CD68 ⁺		9% ± 9%	42% ± 36%
Microglial cells (HLA-DR ⁺ CD14 ⁺ GAFL ⁺)		10% ± 11%	44% ± 27%
Blood-derived macrophages (HLA-DR ⁺ CD14 ⁺ GAFL ^{lo-})		3% ± 5%	16% ± 20%
Neutrophils (CD15 ^{hi} /CD16 ^{hi} HLA-DR ⁻)		5% ± 9%	20% ± 21%
MDSC (CD15 ^{lo} CD16 ⁻ HLA-DR ⁻)		4% ± 8%	15% ± 23%
TIL		2% ± 2%	10% ± 15%
T-cells (CD3 ⁺)		1.4% ± 2%	8% ± 9%
CD4 ⁺ CD8 ⁻ T-cells		0.5% ± 0.7%	2% ± 4%
CD8 ⁺ CD4 ⁻ T-cells		0.6% ± 0.7%	5% ± 7%
CD8 ⁻ CD4 ⁻ T-cells		0.2% ± 0.4%	2% ± 4%
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ T-regs		0.1% ± 0.2%	0.4% ± 0.5%
B-cells (CD19 ⁺ CD20 ⁺)		0.1% ± 0.2%	0.5% ± 1%
NK-cells (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)		0.05% ± 0.05%	1% ± 5%

Note: Results expressed as mean ± SD percentage of cells from the whole tumor sample cellularity and from the parental cell population (either tumor cells or all immune cells).

Abbreviations: GAFL, green autofluorescence; TAM, Tumor-associated macrophages (i.e. microglial cells and blood-derived macrophages); TIL, Tumor-infiltrating lymphocytes.

FACS sorting of CD45⁺CD11b⁺HLA-DR⁺CD14⁺ followed by hematoxylin and eosin staining confirmed the morphological characteristics of these cells were finally compatible with TAMs, while purified GBM tumor cells lacked positivity for CD45 by immunohistochemistry (Figure S1).

3.2 | Distribution and phenotypic features of tumor cells and immune cells in GBM

Most cells in GBM samples corresponded to non-hematopoietic tumor and normal residual astrocytic cells — mean ± 1 standard deviation (SD) of 73% ± 16% — while

the remaining cells in the same tumor specimens were mostly immune cells (mean \pm 1SD: 24% \pm 18%) (Table 2). Coexistence of mature GFAP⁺CD45⁻ GBM neoplastic cells (mean \pm 1SD: 52% \pm 25%) with a smaller fraction of (more immature) GFAP⁺SOX2⁺ GBM tumor cells (mean \pm 1SD: 20% \pm 26%) was systematically detected in every GBM sample analyzed (Table 2). However, highly variable percentages of each of these two tumor cell populations were found among the different tumors (Table 2). From the phenotypic point of view, GFAP⁺CD45⁻ tumor cells displayed highly heterogeneous (low to intermediate) FSC and SSC features, together with variable percentages of cells (mean \pm 1SD) positive for the EGFR tyrosine-kinase growth factor receptor (14% \pm 26%), the CD24 tetraspanin (24% \pm 32%), the hyaluronic acid receptor CD44 (61% \pm 34%) and the CD192 (CCR2) chemokine receptor (27% \pm 26%). In turn, around half of all SOX2⁺ tumor cells also expressed the stem cell-associated marker CD133 (mean \pm 1SD: 48% \pm 41%) for a total of (mean \pm 1SD) 8% \pm 10% of all cells in the tumor samples investigated (Table 2), thereby revealing the existence of a significant fraction of SOX2⁺CD133⁻ cells.

CD45⁺ immune cells represented (mean \pm 1SD) 24% \pm 18% of the whole sample cellularity. Among them, myeloid cells clearly predominated (mean \pm 1SD: 90% \pm 15%) over lymphoid cells (mean \pm 1SD: 10% \pm 15%) (Table 2). Within myeloid cells, TAM was the most represented cell population (mean \pm 1SD: 61% \pm 28%) including similar frequencies of M1-like (HLA-DR⁺CD14⁺CD192⁺) and M2-like (HLA-DR⁺CD14⁺CD206⁺ and/or CD163⁺) TAM (Table 2). Overall, TAM showed variable levels of expression and heterogeneous percentages (mean \pm 1SD) of CD33⁺ (45% \pm 29%), CD16⁺ (16% \pm 20%), CD44⁺ (35% \pm 30%) and CD68⁺ (42% \pm 36%) cells. Within TAM, microglial cells were almost three times more abundant than blood-derived macrophages (mean percentage \pm 1SD: 44% \pm 27% vs. 16% \pm 20%, respectively; $p < 0.001$). Apart from TAM, neutrophils were the second most frequent myeloid cell population and they

accounted for a mean \pm 1SD of 20% \pm 21% of all immune cells, while MDSC were found at slightly lower frequencies (mean \pm 1SD: 15% \pm 23%) (Table 2). Within lymphocytes, T-cells (mean \pm 1SD: 8% \pm 9%) predominated over both NK-cells (mean \pm 1SD: 1% \pm 5%) and B-cells (mean \pm 1SD: 0.5% \pm 1%), with progressively lower (mean \pm 1SD) frequencies of CD8⁺CD4⁻ T-lymphocytes (5% \pm 7%), CD4⁺CD8⁻ (2% \pm 4%) and CD4⁻CD8⁻ double-negative cytotoxic T-lymphocytes (2% \pm 4%), in addition to a minor population (0.4% \pm 0.5%) of T-regs (Table 2). Among all cells described above, only TAM showed baseline ex vivo production of TGF- β (mean \pm 1SD: 5% \pm 9%) together with a minor proportion of IL-10 producing cells (mean \pm 1SD: 0.2% \pm 0.5%).

Once GBM tissue specimens studied at diagnosis ($n = 44$) were compared with samples evaluated at tumor recurrence/progression ($n = 11$) after (median: 4 months) chemotherapy and radiotherapy, no significant differences ($p > 0.05$) in the relative distribution of the distinct tumor cell and immune cell subsets identified was observed between the two groups of samples (Table 3). Despite this, paired tumor samples from two GBM patients studied at diagnosis and at relapse showed a higher fraction of tumor-infiltrating leucocytes at relapse versus diagnosis (24% vs. 70% and 12% vs. 20%, respectively) associated with either decreased or similar numbers of microglial cells (9% vs. 57% and 14% vs. 15%, respectively) and slightly increased neutrophil (5% vs. 1%, 2% vs. 0.6%, respectively) and MDSC (5% vs. 0.4% and 1% vs. 0.1%, respectively) counts. Different percentages of the later two myeloid cell populations were also found when paired samples from a bilateral tumor were compared with a unique sample at relapse (32% vs. 3% and 5% neutrophils and 22% vs. 17% MDSC in the right side with the exception of an increase of this population on the left side which was 50%, were found in the tumor at relapse versus right and left tumors at diagnosis, respectively) (Table S4).

Cell population	Diagnostic tumor samples (n = 44 ^a)	Recurrence tumor samples (n = 11)	p-value
Total tumor cells	71% (29-97%)	75% (26-96%)	0.53
Stem cell-like tumor (SOX2 ⁺)	12% (0.8-82%)	1% (0.5-19%)	0.17
Mature tumor cells (SOX2 ⁻)	63% (11-92%)	76% (54-78%)	0.31
Immune cells	20% (0.2-75%)	18% (3-65%)	0.78
Microglia	8% (0.4-57%)	14% (7-43%)	0.09
Blood-derived macrophages	2% (0.07-34%)	5% (0.2-8%)	0.86
Neutrophils	2% (<0.01-45%)	3% (0.02-32%)	0.68
MDSC	1% (<0.01-51%)	1% (0.3-22%)	0.38
TIL	1% (<0.01-12%)	1% (0.01-6%)	0.46

TABLE 3 Relative distribution of tumor cell and immune cell populations in fresh diagnostic versus recurrence GBM tumor tissue samples ($n = 55$)

^a2/44 samples corresponded to paired samples from a patient with a bilateral tumor. Results expressed as median (range) percentage of cells from the whole tumor sample.

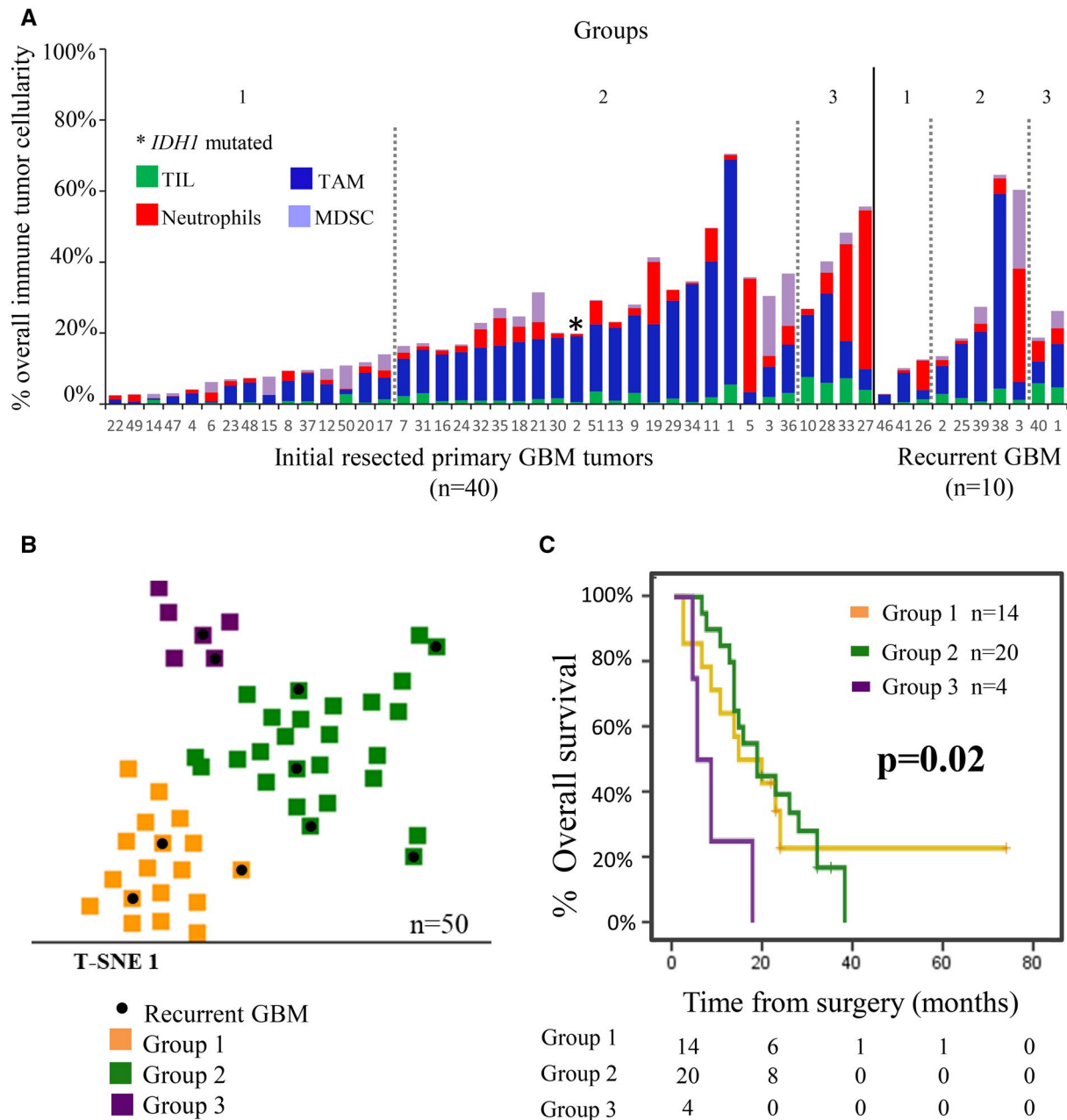


FIGURE 2 Immune cell composition of GBM samples classified according to their overall infiltrating immune profile and its impact on patient overall survival. Immune cell contents defined three subsets of primary diagnostic GBM samples (n = 40) including: (i) GBM with minor immune cell infiltrates (Group 1; n = 15); (ii) GBM with a predominance of TAM and neutrophils with minor percentages of lymphocytes (Group 2; n = 21); and (iii) GBM with immune cell infiltrates that consist of a mixture of TAM, neutrophils, and lymphocytes (Group 3; n = 4) (panel A). Based on the same criteria, recurrent GBM tumors (n = 10) were also classified into Group 1 (n = 3), Group 2 (n = 5), and Group 3 (n = 2) GBM. A 2-dimension t-SNE representation of the distribution of the 50 (color-coded) tumors corresponding to each of the three groups identified—Group 1 (orange), Group 2 (green), and Group 3 (violet)—are shown in panel B, where recurrent GBM tumors are depicted in black. In panel C, the impact of the distinct immune cell profiles identified (labeled with the same color codes as in panel B) on overall survival of newly diagnostic patients after excluding those who were alive but had a follow-up of less than 18 months and/or died within the 1st month after surgery (n = 38), is shown [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Immunohistochemical analyses performed in a subset of 10 GBM samples revealed a major fraction of GBM tumor cells (mean ± 1SD: 77% ± 20%) in addition to variable percentages of residual non-tumor cells (mean ± 1SD: 16% ± 12%) along with a small percentage of TIL (mean ± 1SD: 2.5% ± 1.4%) in the absence

of a significant correlation with the percentage of cells obtained by flow cytometry in the same tumor (Figure S2A). Similarly, no significant correlation was observed between the distribution of major peripheral blood leucocyte subsets in paired blood and tumor samples. (Figure S2B).

TABLE 4 Distribution of immune cell populations among the three groups of GBM patients showing distinct infiltrating immune profiles as identified by the t-SNE machine learning algorithm (n = 50)

	GBM immune cell groups			
	Group 1 (n = 18)	Group 2 (n = 26)	Group 3 (n = 6)	p-value
% Immune cells	8% ± 6%	31% ± 15%	35% ± 15%	<0.001***
% TAM	4% ± 3%	20% ± 14%	13% ± 7%	<0.001*, 0.002**
% Microglial cells	2% ± 2%	15% ± 13%	9% ± 3%	<0.001*, 0.003**
% Blood-derived macrophages	1% ± 2%	5% ± 6%	3% ± 15%	0.013*
% Neutrophils	2% ± 2%	6% ± 9%	15% ± 17%	0.003*, 0.001**
% MDSC	2% ± 2%	3% ± 6%	2% ± 2%	NS
% TIL	0.6% ± 0.7%	2% ± 1%	6% ± 1%	<0.001*****
% T-cells	0.5% ± 0.5%	2% ± 1%	6% ± 2%	0.002*, 0.03*****
T CD4 ⁺ CD8 ⁻	0.2% ± 0.2%	0.8% ± 0.8%	3% ± 0.1%	0.02*, 0.03**
T CD8 ⁺ CD4 ⁻	0.2% ± 0.2%	0.6% ± 0.5%	2% ± 1%	0.006*, 0.026**
T CD8 ⁻ CD4 ⁻	0.06% ± 0.06%	0.1% ± 0.1%	1% ± 1%	0.026**
T-regs	0.02% ± 0.02%	0.2% ± 0.3%	0.1% ± 0.07%	0.004*, 0.048**
% B-cells	0.03% ± 0.04%	0.1% ± 0.3%	0.5% ± 0.4%	0.026**, 0.049***
% NK-cells	0.05 ± 0.05%	0.03% ± 0.03%	0.2% ± 0.03%	0.026**, 0.015***

Note: Results expressed as mean ± 1 SD percentage of cells from the whole sample cellularity.

Abbreviations: NS, no significant differences found ($p > 0.05$); t-SNE: t-distributed stochastic neighbor embedding.

*Group 1 versus Group 2; **Group 1 versus Group 3; ***Group 2 versus Group 3.

3.3 | Association between the tumor immune profile and the clinical and genetic features of the disease

According to the relative cellular composition of tumor samples by flow cytometry, three different groups of GBM patients were identified by (multivariate) t-SNE analysis (based on machine learning algorithms) among the 50 patients investigated (after excluding one outlier) (Figure 2A,B). These groups included: (1) cases with limited immune cell infiltrate (Group 1; n = 18); (2) tumors displaying an immune cell infiltrate with clear predominance of TAM and neutrophils together with residual percentages of lymphocytes, particularly T-cells (Group 2; n = 26); and (3) tumors with an immune infiltrate consisting of a mixture of TAM, neutrophils, and lymphocytes, mostly TCD8⁺ and TCD4⁺ cells (Group 3; n = 6) (Table 4 and Figure 2A,B). No significant association was found between these three GBM immune profiles (Groups 1 to 3) and patient age, gender, Karnofsky index (KPS), and type of surgery performed at diagnosis (Table 5).

From the genetic point of view, all patients investigated but one (45/46) showed a wild-type *IDH* gene status (Table S1). In contrast, the great majority of the tumor samples analyzed (50/54; 93%) showed either the gain of *EGFR* (30/54; 55%) or *EGFR* amplification (20/54; 37%). *EGFR* protein expression levels by the flow cytometry were higher among GBM tumors that showed gain or amplification of *EGFR* (n = 50) versus no alteration (n = 4) of this

gene—mean fluorescence intensity (MFI) of 2765 ± 4191 versus 387 ± 440, respectively ($p = 0.001$)— (Figure S1). Interestingly, patients that had gains of *EGFR* (n = 30) displayed a greater percentage of tumor infiltration by TAM (18% ± 15%; $p = 0.010$) and lymphocytes (2% ± 2%; $p = 0.040$) compared to those that displayed *EGFR* gene amplification (9% ± 7% and 1% ± 2%, respectively); in contrast, those few tumors (n = 4) that showed no gains or amplification of *EGFR* had lower percentages of TAM (8% ± 9%; $p > 0.05$) with greater levels of lymphocytes (5% ± 4%; $p > 0.05$). These differences translated into different *EGFR* genetic profiles among the three previously defined groups of GBM based on their tumor-infiltrating immune cell profiles (Table 5). Thus, *EGFR* amplification predominated in Group 1 tumors (56% vs. 35% and 20% in groups 2 and 3, respectively), while *EGFR* gains were more frequently observed in Group 2 tumors (65% vs. 39% and 40% in groups 1 and 3, respectively) and most tumors with a diploid *EGFR* profile were concentrated in Group 3 (40% vs. 6% and 0% in groups 1 and 2, respectively) ($p = 0.01$) (Table 5).

From the prognostic point of view, the immune profile of newly diagnosed, untreated GBM showed a clear impact on patient survival ($p = 0.02$), cases with immune infiltrates consisting of a mixture of TAM, neutrophils, and T-cells (Group 3) showing a significantly poorer outcome compared to the other two GBM patient groups (Groups 1 and 2): median overall survival of 6 months versus 16 and 18 months, respectively (Figure 2C).

TABLE 5 Association between clinical and genetic features of GBM and the frequency of different immune cells and immune profiles found in GBM samples

Clinical and genetic variables	GBM Immune cell populations				GBM Immune cell profile		
	TAM	Neutrophils	MDSC	TIL	Group 1	Group 2	Group 3
Karnofsky index							
>70	15% ± 14%	5% ± 8%	3% ± 5%	2% ± 2%	70%	63%	60%
≤70	12% ± 8%	6% ± 12%	2% ± 4%	2% ± 2%	30%	37%	40%
<i>p</i> -value	NS	NS	NS	NS	NS		
Age							
18-45 years	16% ± 22%	2% ± 2%	1% ± 1%	1% ± 2%	18%	4%	–
46-65 years	13% ± 12%	4% ± 6%	5% ± 11%	2% ± 3%	59%	50%	40%
66-85 years	81% ± 11%	8% ± 13%	2% ± 3%	2% ± 2%	23%	46%	60%
<i>p</i> -value	NS	NS	NS	NS	NS		
Gender							
Female	12% ± 9%	4% ± 6%	2% ± 3%	2% ± 2%	50%	42%	40%
Male	15% ± 14%	7% ± 10%	4% ± 10%	2% ± 3%	50%	57%	60%
<i>p</i> -value	NS	NS	NS	NS	NS		
Type of resection							
Partial	17% ± 12%	4% ± 7%	2% ± 4%	2% ± 2%	29%	38%	25%
Complete	12% ± 13%	6% ± 10%	2% ± 4%	2% ± 2%	71%	54%	75%
<i>p</i> -value	NS	NS	NS	NS	NS		
EGFR profile^b							
No EGFR gains/AMP	8% ± 9%	3% ± 2%	1% ± 2%	5% ± 4%	6%	–	40%
EGFR gains	18% ± 15%	5% ± 9%	1% ± 1%	2% ± 2%	39%	65%	40%
EGFR AMP	9% ± 7%	6% ± 9%	3% ± 4%	1% ± 2%	56%	35%	20%
<i>p</i> -value	0.010 ^a	NS	NS	0.040 ^a	0.010		

Note: Results expressed as mean (±1SD) percentage of cells from the whole tumor sample (n = 50).

Abbreviations: AMP, Amplification; NS, no significant differences found (*p* > 0.05).

^aEGFR gains versus EGFR amplification.

^bIDH1 status evaluated by immunohistochemistry showed absence of labeling for IDH1 consistent with the wild-type IDH1 gene as confirmed by further molecular analyses in 45 of 46 samples.

4 | DISCUSSION

In the present study, we used flow cytometry for the detailed phenotypic characterization of the different tumor cell and immune cell populations that coexist in GBM. In line with previous studies in other brain tumors (38) and also GBM, our results confirmed the systematic presence of immune cell infiltrates together with the GBM tumor cells, their relative proportion varying substantially among the individual tumors analyzed. Combined staining for GFAP and CD45, allowed clear cut discrimination between GFAP⁺CD45⁻ GBM tumor and normal astrocytic cells and GFAP⁻CD45⁺ immune cells, in line with previous observations by others (3,39). Despite the fact that GFAP is also expressed in normal astrocytes (40) and thereby, it is not a tumor-specific marker, staining for GFAP together with CD45 contributed to the unequivocal identification of the tumor-infiltrating immune cells in tissues that predominantly consisted of tumor cells. Among GBM tumor (and normal astrocytic)

cells, two major cell subsets were further identified based on the presence versus absence of expression of SOX2: a major population of (phenotypically more mature) SOX2⁻ tumor cells together with a smaller fraction of (phenotypically more immature) SOX2⁺ cells. A smaller fraction of the later tumor cells showed positivity for the CD133 cancer-stem-cell-associated. Several studies have shown that CD133 is one of the most reliable markers for the identification of GBM cancer stem cells which also coexpress SOX2 (41,42). Of note, most previous studies have specifically investigated SOX2 expression within the CD133⁺ population of GBM cells, while they do not provide information on the remaining CD133⁻ tumor cells (43). In this regard, our results show coexpression of SOX2 on CD133⁺ GBM cells at the same time they reveal the existence of a significant fraction of SOX2⁺CD133⁻ cells among GFAP⁺ GBM cells. Altogether, these findings would indicate that the minor subset of CD133⁺SOX2⁺ GBM tumor cells might contain GBM cancer stem cells which were represented at different percentages in each

individual tumor sample. However, the biological and clinical significance of these CD133⁺SOX2⁺ tumor cells, and particularly of SOX2⁺CD133⁻ cells, remains to be determined. Similar to CD133 and SOX2, variable percentages of tumor cells were also found to express other growth factor receptors (EGFR) and adhesion molecules (CD24, CD44) which are known to be positive in GBM tumor cells (44). These results further emphasize the existence of a highly heterogeneous tumor cell hierarchy in GBM with a clear association between specific genetic alterations and protein expression profiles (45), as confirmed here for the *EGFR* protein expression levels and the *EGFR* gene status. Despite this, no clear association between the protein expression profiles of GBM tumor cells for the different markers investigated here and neither patient features at diagnosis nor the patient outcome was observed (data not shown).

Regarding immune cells, highly variable levels of tumor-infiltrating leucocytes consisting of different admixtures of immune cells in which myeloid cells predominated over lymphoid cells were also observed among the tumor samples analyzed herein, in line with previous observations (46). Among myeloid cells, microglial cells and blood-derived TAM, neutrophils, and MDSC were found at progressively lower mean overall frequencies, in association with (much) smaller numbers of TIL (T-lymphocytes and to a less extent also B-cells and NK-cells). To the best of our knowledge, this is the first study in which all above cell populations were simultaneously assessed in individual GBM tumor specimens from a relatively large series of human GBM samples based on a comprehensive multicolor antibody panel assessed by flow cytometry (47,48). In previous studies in both murine and human models, microglial cells have been defined based on the expression of myeloid markers such as CD11b, and CD45 (49). However, in our study, these markers on their own were insufficient (39) for accurate identification of microglial cells and their discrimination from other myeloid cell populations of tumor-infiltrating leucocytes. Thus, several other markers such as (CD14, HLADR, and CD15) were required—in addition to baseline (green) autofluorescence levels—to discriminate among the distinct populations of microglial and BM-derived TAM, neutrophils, and MDSC. Simultaneous staining for CD15, CD16, and CD11b, in addition to HLA-DR and CD14, provided unequivocal discrimination between CD14⁺HLADR⁺TAM (including microglial and blood-derived TAM) and both CD15^{hi}CD16^{hi}CD11b⁺HLADR⁻CD14⁻neutrophils and CD15⁺CD16⁻CD11b⁺HLADR^{-/lo} MDSC (46). Additional (conventional) (30,50,51) markers were used for the discrimination among the remaining CD45^{hi} lymphoid cells including CD3⁺ T-cells (and their subsets), CD4⁺CD25^{hi} T-regs and both CD19⁺CD20⁺ B-lymphocytes and SSC^{lo}CD16⁺ NK-cells.

Overall, among tumor-infiltrating leucocytes, TAM were the most represented cell population, including

microglial cells and at lower percentages also blood-derived macrophages. Previous studies suggest that predominance of M1-like versus M2-like TAM may be associated with a better outcome of GBM, while higher levels of M2-like TAM could be related to tumor growth and progression (52). Here, we investigated the pattern of expression of three (CD192, CD206, and CD163) markers that have been related to these two different polarization states of TAM (52,53). Despite variable and heterogeneous expression profiles were observed for each of the three markers, we could still discriminate between M1-like and M2-like TAM based on the expression of CD192 for the identification of M1-like cells, and positivity for CD163 and/or CD206 for the definition of M2-like cells. Based on these criteria, an overall similar proportion of M1-like and M2-like TAM was identified with no clearly defined tumor subgroups based on the predominance of M1-like versus M2-like TAM. In turn, neutrophils and MDSC were represented at almost similar, but lower and more variable proportions, whereas TIL were less represented (typically <10% of all tumor-infiltrating leucocytes), also at variable percentages among different tumors. A more detailed analysis of the TIL showed clear predominance of T-cells, particularly TCD8⁺ cells and to a less extent TCD4⁺ and TCD4⁻CD8⁻ T-cells, with very minor numbers of T-regs, B-cells and NK-cells. Overall, these results confirm and extend on previous observations in which only part of all above subsets of tumor-infiltrating leucocytes had been assessed (26,50). Despite all the above, no significant correlation was found between flow cytometry and immunohistochemical data evaluated in parallel for a few major cell populations, pointing out the need for more in-depth studies to better define and understand the value of flow cytometric analyses of tumor-infiltrating immune cells in GBM.

Interestingly, however, simultaneous assessment of all subsets of tumor cells and immune cells in individual tumors via multivariate analyses identified three clearly distinct immune cell profiles among our cases. These included: (i) a major group of GBM with limited immune cell infiltrates; (ii) tumors with the predominance of myeloid cells (TAM and neutrophils) together with residual percentages of lymphocytes, particularly T-cells; and (iii) a smaller group of tumors with immune cell infiltrates that consisted of a mixture of TAM, neutrophils, and T-lymphocytes, mostly TCD8⁺ and TCD4⁺ T-cells. At present, there is only a limited number of studies in which various immune cell populations of tumor-infiltrating leucocytes have been simultaneously assessed in large series of GBM (14,26). Despite this, Zhang et al (54) have recently investigated immune profiles of GBM tumor based on gene expression profiling. Interestingly, they identified three different immune (microenvironment) profiles, among which the predominance of TAM-related gene expression profiles was associated with a better patient outcome. Although the direct correlation between our

data and the GEP defined by Zhang et al cannot be made, among our patients, those that had tumors with a predominance of TAM showed a comparable (better) outcome to tumors that displayed minimal immune cell infiltrates. In contrast, in our cohort, patients that showed mixed infiltrates of TAM, neutrophils, and lymphocytes, had a significantly poorer overall survival.

Previous studies in gliomas suggest that both the predominance of TAM over other immune cell populations (55), and the presence of tumor infiltrates enriched in neutrophils and MDSC are both associated with poorer prognostic disease features (24,56), which may be due to the inhibitory effects of these myeloid cells on T-cells, and their contribution to an immunosuppressive tumor microenvironment (57). Thus, in gliomas, the extent of neutrophil (58) and MDSC (57) infiltration has been positively correlated with tumor grade. In contrast, the presence of TIL, particularly of TCD8⁺ cells, has been associated in several studies with enhanced survival (50). However, controversial results have been reported in the literature in this regard and in some recent studies, higher levels of both TCD3⁺ and TCD8⁺ tumor-infiltrating cells have been associated with shorter survival (26). Such apparent discrepancies may be due to the fact that patient outcome might not be directly related to the specific proportion of TAM, lymphocytes, TCD4⁺ or TCD8⁺ cells per se, but it is more likely associated with the overall tumor-infiltrating leucocytes immune profile (25). In line with this hypothesis, here we did not find any significant association between the percentage of TAM, neutrophils, MDSC, and T-cells on patient outcome. In contrast, a unique immune cell profile based on an admixture of TAM, neutrophils, and relatively high T-lymphocyte counts, was associated with a significantly shorter OS. In contrast, despite the potential clinical relevance of NK-cells and T-regs, here they represented a very minor tumor cell compartment, their numbers showing no clear impact on disease outcome (59).

Previous studies have identified gender (26), age (50), KPS index (60), type of surgery (61), type of treatment (40), and tumor genetics (e.g., *EGFR* gene status (4,62) and epigenetics (MGMT-methylation) (61) to be associated with the outcome (i.e., OS) of GBM. In contrast, only a few studies have investigated the impact of the tumor microenvironment, particularly the immune microenvironment on patient OS. Our results showed no clear association between the tumor immune cell profile and the patient KPS, age, gender, and type of surgery. In contrast, a clear association between the cellular composition of the immune infiltrates the *EGFR* gene status was observed. *EGFR* has long been known to be altered in most GBM patients, and to play a key role in the oncogenesis and clinical behavior of GBM (62,63). In this regard, a high percentage of chromosome 7 copy number alterations, (i.e., trisomy and polysomy associated

or not with the amplification of the *EGFR* gene) have also been previously described in GBM in the literature, in which the percentage of *EGFR* gene amplification ranges from 30% to 70% of all tumors depending on the techniques used, at the same time numerical alterations of chromosome 7 would occur in up to 90% of *EGFR* non-amplified cases (45,64), in line with our results. Despite this, few studies have investigated the potential relationship between *EGFR* gene alterations and the immune profile in GBM. Thus, An et al (65) have shown that wild-type *EGFR* and some *EGFR* mutants (e.g., *EGFRvIII*) cooperate to induce macrophage infiltration. In turn, Hao et al (66) reported higher levels of tumor infiltration by TCD4⁺ lymphocytes, neutrophils, and dendritic cells to be associated in low-grade gliomas with shorter survival among *EGFR*-mutated cases. Here, *EGFR* amplification was associated with minimal immune cell infiltrates, while *EGFR* gains predominated in cases with TAM plus neutrophil infiltrates and a diploid *EGFR* gene status was highly characteristic of tumors with mixed myeloid and T-lymphoid tumor infiltration. These results are in line with previous studies in which an association between *EGFR* gene amplification and a better patient outcome has been reported (62) and point out a potential link between the tumor genetic and immune profiles.

In summary, here we show that immune cell infiltrates which consist of distinct immune profiles are systematically present at highly variable levels in GBM, the presence of mixed myeloid (TAM plus neutrophils) and T-lymphoid infiltrates being associated with unique *EGFR* genetic features and a significantly poorer patient outcome.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CIBERONC (grant CB16/12/00400 CIBERONC, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain) the ISCIII PI16/0476 grant (Instituto de Salud Carlos III), Fondos FEDER and GRS2049/A/19 grant (Consejería de Sanidad Junta de Castilla y León, Gerencia Regional de Salud, Spain).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have contributed significantly to this article. Study design: Alberto Orfao and María Dolores Tabernero. Samples and clinical data collection: Álvaro Otero, Daniel Arandia, Daniel Pascual, Laura Ruíz, Pablo Sousa, Andoni García, Juan Carlos Roa, Jorge Javier Villaseñor, Luis Torres, J Ortiz and Adelaida Nieto. Methodology and analysis: Maria do Rosario Almeida, María González-Tablas and María Dolores Tabernero. Writing - original draft preparation: María González-Tablas, Alberto Orfao, and María Dolores Tabernero. All authors have read and approved the final version.

ETHICAL APPROVAL

All procedures performed in this study were in accordance with the 1964 Helsinki declaration. All enrolled patients provided written informed consent.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The clinical data associated with this paper are available in Table S1.

ORCID

María González-Tablas Pimenta  <https://orcid.org/0000-0001-9774-1558>

Álvaro Otero  <https://orcid.org/0000-0001-9421-7830>

Daniel Angel Arandía Guzman  <https://orcid.org/0000-0001-5748-8762>

Daniel Pascual-Argente  <https://orcid.org/0000-0002-1942-1134>

Laura Ruiz Martín  <https://orcid.org/0000-0001-7990-3998>

Pablo Sousa-Casasnovas  <https://orcid.org/0000-0003-3085-8238>

Andoni García-Martin  <https://orcid.org/0000-0001-5948-5370>

Juan Carlos Roa Montes de Oca  <https://orcid.org/0000-0002-8294-0826>

Javier Villaseñor-Ledezma  <https://orcid.org/0000-0002-7280-3422>


Luis Torres Carretero  <https://orcid.org/0000-0001-9034-7750>

María Almeida  <https://orcid.org/0000-0002-1889-5469>

Javie Ortiz  <https://orcid.org/0000-0003-4171-167X>

Adelaida Nieto  <https://orcid.org/0000-0001-7898-4829>

Alberto Orfao  <https://orcid.org/0000-0002-0007-7230>

María Dolores Tabernero  <https://orcid.org/0000-0002-4430-9806>

REFERENCES

- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131:803–20.
- Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129:829–48.
- Giering A, Psczolkowska D, Walentynowicz KA, Rajan WD, Kaminska B. Immune microenvironment of gliomas. *Lab Invest.* 2017;97:498–518.
- González-Tablas M, Crespo I, Vital AL, Otero Á, Nieto AB, Sousa P, et al. Prognostic stratification of adult primary glioblastoma multiforme patients based on their tumor gene amplification profiles. *Oncotarget.* 2018;9:28083–102.
- Chen Z, Hambardzumyan D. Immune microenvironment in glioblastoma subtypes. *Front Immunol.* 2018;9:1004
- Eder K, Kalman B. The dynamics of interactions among immune and glioblastoma cells. *NeuroMol Med.* 2015;17:335–52.
- Domingues P, González-Tablas M, Otero Á, Pascual D, Miranda D, Ruiz L, et al. Tumor infiltrating immune cells in gliomas and meningiomas. *Brain Behav Immun.* 2016;53:1–15.
- Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro-Oncology.* 2006;8:261–79.
- Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24:541–50.
- Brown NF, Carter TJ, Ottaviani D, Mulholland P. Harnessing the immune system in glioblastoma. *Br J Cancer.* 2018;119:1171–81.
- Pellegatta S, Eoli M, Frigerio S, Antozzi C, Bruzzone MG, Cantini G, et al. The natural killer cell response and tumor debulking are associated with prolonged survival in recurrent glioblastoma patients receiving dendritic cells loaded with autologous tumor lysates. *OncoImmunology.* 2013;2:e23401.
- Perng P, Lim M. Immunosuppressive mechanisms of malignant gliomas: parallels at non-CNS sites. *Front Oncol.* 2015;5:153.
- Yang W, Li Y, Gao R, Xiu Z, Sun T. MHC class I dysfunction of glioma stem cells escapes from CTL-mediated immune response via activation of Wnt/β-catenin signaling pathway. *Oncogene.* 2020;39:1098–111.
- Jack AS, Lu J-Q. Immune cell infiltrates in the central nervous system tumors. *Austin Neurosurg Open Access.* 2015;2(1):1024.
- Kaminska B, Kocyk M, Kijewska M. TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2013;986:171–87.
- Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol.* 2004;22:1136–51.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683–765.
- Gousias K, von Ruecker A, Voulgari P, Simon M. Phenotypical analysis, relation to malignancy and prognostic relevance of ICOS+T regulatory and dendritic cells in patients with gliomas. *J Neuroimmunol.* 2013;264:84–90.
- Feng X, Szulzewsky F, Yerevanian A, Chen Z, Heinzmann D, Rasmussen RD, et al. Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget.* 2015;6:15077–94.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:451–83.
- Alban TJ, Alvarado AG, Sorensen MD, Bayik D, Volovetz J, Serbinowski E, et al. Global immune fingerprinting in glioblastoma patient peripheral blood reveals immune-suppression signatures associated with prognosis. *JCI Insight.* 2018;3:e122264.
- Gielen PR, Schulte BM, Kers-Rebel ED, Verrijp K, Petersen-Baltussen HMJM, Ter Laan M, et al. Increase in both CD14-positive and CD15-positive myeloid-derived suppressor cell subpopulations in the blood of patients with glioma but predominance of CD15-positive myeloid-derived suppressor cells in glioma tissue. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74:390–400.
- Jacobs JFM, Idema AJ, Bol KF, Grotenhuis JA, de Vries IJM, Wesseling P, et al. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J Neuroimmunol.* 2010;225:195–9.
- Raychaudhuri B, Rayman P, Huang P, Grabowski M, Hambardzumyan D, Finke JH, et al. Myeloid derived suppressor cell infiltration of murine and human gliomas is associated with reduction of tumor infiltrating lymphocytes. *J Neurooncol.* 2015;122:293–301.
- Farmer J-P, Antel JP, Freedman M, Cashman NR, Rode H, Villemure J-G. Characterization of lymphoid cells isolated from human gliomas. *J Neurosurg.* 1989;71:528–33.
- Orrego E, Castaneda CA, Castillo M, Bernabe LA, Casavilca S, Chakravarti A, et al. Distribution of tumor-infiltrating immune cells in glioblastoma. *CNS. Oncology.* 2018;7:CNS21.
- Bregy A, Wong TM, Shah AH, Goldberg JM, Komotar RJ. Active immunotherapy using dendritic cells in the treatment of glioblastoma multiforme. *Cancer Treat Rev.* 2013;39:891–907.

28. Buerki RA, Chheda ZS, Okada H. Immunotherapy of primary brain tumors: facts and hopes. *Clin Cancer Res.* 2018;24:5198–205.
29. Huang B, Zhang H, Gu L, Ye B, Jian Z, Stary C, et al. Advances in immunotherapy for glioblastoma multiforme. *J Immunol Res.* 2017;2017:1–11.
30. Han S, Ma E, Wang X, Yu C, Dong T, Zhan W, et al. Rescuing defective tumor-infiltrating T-cell proliferation in glioblastoma patients. *Oncology Letters.* 2016;12:2924–9.
31. Cengage G, ed. *DNA Isolation Methods.* World of Forensic Science; 2006.
32. Paz-Bouza JI, Orfao A, Abad M, Ciudad J, Garcia MC, Lopez A, et al. Transrectal fine needle aspiration biopsy of the prostate combining cytomorphologic, DNA ploidy status and cell cycle distribution studies. *Pathol Res Pract.* 1994;190:682–9.
33. Groeneveld K, te Marvelde JG, van den Beemd MW, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes. *Leukemia.* 1996;10:1383–9.
34. Smith PJ, Wiltshire M, Davies S, Patterson LH, Hoy T. A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1999;229:131–9.
35. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* 2012;26:1986–2010.
36. Matarraz S, Fernandez C, Albors M, Teodosio C, López A, Jara-Acevedo M, et al. Cell-cycle distribution of different cell compartments in normal versus reactive bone marrow: a frame of reference for the study of dysplastic hematopoiesis. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011;80B:354–61.
37. Van der Maaten L, Hinton G. Visualizing data using t-SNE. *J Mach Learn Res.* 2008;9:2579–605.
38. Domingues PH, Teodósio C, Ortiz J, Sousa P, Otero Á, Maillo A, et al. Immunophenotypic identification and characterization of tumor cells and infiltrating cell populations in meningiomas. *Am J Pathol.* 2012;181:1749–61.
39. Balik V, Mirossay P, Bohus P, Sulla I, Mirossay L, Sarissky M. Flow cytometry analysis of neural differentiation markers expression in human glioblastomas may predict their response to chemotherapy. *Cell Mol Neurobiol.* 2009;29:845–58.
40. Wang J, Hu G, Quan X. Analysis of the factors affecting the prognosis of glioma patients. *Open Medicine.* 2019;14:331–5.
41. Glumac PM, LeBeau AM. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med.* 2018;7:18.
42. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432:396–401.
43. Song W-S, Yang Y-P, Huang C-S, Lu K-H, Liu W-H, Wu W-W, et al. Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. *J Chin Med Assoc.* 2016;79:538–45.
44. Zhang Y, Li B, Zhang X, Sonpavde GP, Jiao K, Zhang A, et al. CD24 is a genetic modifier for risk and progression of prostate cancer. *Mol Carcinog.* 2017;56:641–50.
45. González-Tablas M, Arandia D, Jara-Acevedo M, Otero Á, Vital A-L, Prieto C, et al. Heterogeneous EGFR, CDK4, MDM4, and PDGFRA gene expression profiles in primary GBM: no association with patient survival. *Cancers.* 2020;12:231.
46. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia.* 2011;59:1169–80.
47. Kumar R, de Mooij T, Peterson TE, Kaptzan T, Johnson AJ, Daniels DJ, et al. Modulating glioma-mediated myeloid-derived suppressor cell development with sulforaphane. *PLoS One.* 2017;12:e0179012.
48. Quail DF, Joyce JA. The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer Cell.* 2017;31:326–41.
49. Gabrusiewicz K, Rodriguez B, Wei J, Hashimoto Y, Healy LM, Maiti SN, et al. Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI Insight.* 2016;1:e85841.
50. Kmiecik J, Poli A, Brons NHC, Waha A, Eide GE, Enger PØ, et al. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J Neuroimmunol.* 2013;264:71–83.
51. Kmiecik J, Zimmer J, Chekenya M. Natural killer cells in intracranial neoplasms: Presence and therapeutic efficacy against brain tumours. *J Neurooncol.* 2014;116:1–9.
52. Szulzewsky F, Pelz A, Feng X, Synowitz M, Markovic D, Langmann T, et al. Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. *PLoS One.* 2015;10:1–27.
53. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:1–11.
54. Zhang B, Shen R, Cheng S, Feng L. Immune microenvironments differ in immune characteristics and outcome of glioblastoma multiforme. *Cancer Med.* 2019;8:2897–907.
55. Engler JR, Robinson AE, Smirnov I, Hodgson JG, Berger MS, Gupta N, et al. Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas. *PLoS One.* 2012;7:e43339.
56. Khan S, Mittal S, McGee K, Alfaro-Munoz KD, Majd N, Balasubramanian V, et al. Role of neutrophils and myeloid-derived suppressor cells in glioma progression and treatment resistance. *Int J Mol Sci.* 2020;21:1954.
57. Guadagno E, Presta I, Maisano D, Donato A, Pirrone CK, Cardillo G, et al. Role of macrophages in brain tumor growth and progression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1005.
58. Liang J, Piao Y, Holmes L, Fuller GN, Henry V, Tiao N, et al. Neutrophils promote the malignant glioma phenotype through S100A4. *Clin Cancer Res.* 2014;20:187–98.
59. Alizadeh D, Zhang L, Brown CE, Farrukh O, Jensen MC, Badie B. Induction of anti-glioma natural killer cell response following multiple low-dose intracerebral CpG therapy. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3399–408.
60. Liang J, Lv X, Lu C, Ye X, Chen X, Fu J, et al. Prognostic factors of patients with gliomas – an analysis on 335 patients with glioblastoma and other forms of gliomas. *BMC Cancer.* 2020;20:35.
61. Kumar N, Kumar P, Angurana SL, Khosla D, Mukherjee KK, Aggarwal R, et al. Evaluation of outcome and prognostic factors in patients of glioblastoma multiforme: a single institution experience. *J Neurosci Rural Pract.* 2013;4:S46–55.
62. 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.
63. Felsberg J, Hentschel B, Kaulich K, Gramatzki D, Zacher A, Malzkorn B, et al. Epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) positivity in EGFR-amplified glioblastomas: prognostic role and comparison between primary and recurrent tumors. *Clin Cancer Res.* 2017;23:6846–55.
64. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J, et al. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol.* 2010;23(6):856–65.
65. An Z, Knobbe-Thomsen CB, Wan X, Fan QW, Reifenberger G, Weiss WA. EGFR cooperates with EGFRvIII to recruit macrophages in glioblastoma. *Can Res.* 2018;78:6785–94.
66. Hao Z, Guo D. EGFR mutation: novel prognostic factor associated with immune infiltration in lower-grade glioma; an exploratory study. *BMC Cancer.* 2019;19:1184.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

Fig S1

FIGURE S1 Immunohistochemical immunofluorescence and iFISH characterization of FACS-isolated TAM and CD45⁻ tumor and normal astrocytic cells. Immune cells were discriminated from tumor cells and other non-hematopoietic cells based on CD45 positive expression and TAM were further identified based on the coexpression of CD14 and HLADR (panel A). Hematoxylin and eosin staining of FACS-sorted CD45⁺HLADR⁺CD14⁺ cells showed a TAM compatible morphology (panel B) and positive expression for CD45 by immunofluorescence (IF), in contrast to FACS-sorted tumor (and other non-hematopoietic) cells that were CD45⁻ (panel C). Further iFISH analyses revealed *EGFR* gene amplification associated with partial expression of EGFR by flow cytometry (panel D)

Fig S2

FIGURE S2 Correlation between the percentage of immune cell populations in tumor tissues as assessed by flow cytometry and histochemistry (panel A) and in peripheral blood (panels B and C). In panel A, the relationship between the number of leucocytes in peripheral blood and their percentage in the tumor (upper left panel) and between the percentage of neutrophils (upper right panel), monocytes/TAM (lower left panel), and lymphocytes (upper right panel) in blood versus the tumor, is shown. In panel B, the correlation between

the percentage of tumor cells (left panel) and TIL (right panel) in paired tumor specimens evaluated by both flow cytometry and histochemistry is displayed

Table S1

TABLE S1 Overall features of fresh primary human GBM samples (n = 55) analyzed in this study derived from patients investigated at diagnosis (n = 43), after therapy (n = 8) and at both moments (n = 3)

Table S2

TABLE S2 Mutational status of *IDH1* and *IDH2* genes in 46 available GBM tumor samples

Table S3

TABLE S3 Antibody panels, markers and reagents (clones and manufacturers) used in this study for flow cytometry immunophenotypic analyses of primary GBM tumor specimens (n = 55)

Table S4

TABLE S4 Distribution of different subsets of tumor cells, microglial cells and infiltrating leucocytes in paired diagnostic vs recurrent (n = 2) or bilateral (n = 1) tumor samples from three GBM patients

How to cite this article: González-Tablas Pimenta M, Otero Á, Arandia Guzman DA, et al. Tumor cell and immune cell profiles in primary human glioblastoma: Impact on patient outcome. *Brain Pathology*. 2021;31:365–380. <https://doi.org/10.1111/bpa.12927>

SUPPLEMENTARY TABLE 1 Overall features of fresh primary human GBM samples (n=55) analyzed in this study derived from patients investigated at diagnosis (n=43), after therapy (n=8) and at both moments (n=3)

Patient ID	Time of sampling	Age	Sex	KPS	Tumor location	Type of surgical resection	Flow cytometer used for immunophenotypic studies
1*	Diagnosis	57	Male	100	Temporal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
2*	Diagnosis	66	Female	70	Fronto_Parietal/R	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
3*&	Diagnosis	50	Male	90	Temporal_Bilateral/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
4	Diagnosis	60	Female	80	Temporal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
5	Diagnosis	80	Male	90	Occipital/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
6	Diagnosis	27	Female	100	Frontal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
7	Diagnosis	53	Male	90	Temporal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
8	Diagnosis	47	Female	100	Frontal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
9	Diagnosis	72	Male	50	Parietal/L	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
10	Diagnosis	75	Male	90	Frontal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
11	Diagnosis	70	Female	80	Frontal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
12	Diagnosis	77	Male	80	Temporal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
13	Diagnosis	56	Male	50	Frontal_Bilateral	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
14	Diagnosis	69	Female	90	Temporal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
15	Diagnosis	72	Male	90	Frontal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
16	Diagnosis	55	Male	60	Frontal/L	Biopsy	BD LSRFORTESSA X-20
17	Diagnosis	60	Male	80	Temporal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
18	Diagnosis	69	Male	90	Parieto_Occipital/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
19	Diagnosis	74	Male	90	Frontal/L	Biopsy	BD LSRFORTESSA X-20
20	Diagnosis	63	Male	90	Temporal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
21	Diagnosis	61	Male	80	Temporal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
22	Diagnosis	71	Female	70	Parieto_Occipital/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
23	Diagnosis	45	Female	.	Temporal/R	.	BD LSRFORTESSA X-20
24	Diagnosis	70	Female	70	Parietal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
27	Diagnosis	72	Male	70	Temporal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
28	Diagnosis	48	Female	80	Fronto_Parietal/R	.	BD LSRFORTESSA X-20
29	Diagnosis	74	Male	70	Frontal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
30	Diagnosis	54	Male	70	Frontal/L	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
31	Diagnosis	79	Female	40	Frontal/R	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
32	Diagnosis	64	Female	90	Frontal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
33	Diagnosis	78	Female	70	Parietal/R	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
34	Diagnosis	68	Male	80	Fronto_Parietal/L	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
35	Diagnosis	63	Female	80	Temporal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
36	Diagnosis	70	Female	60	Parietal/R	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
37	Diagnosis	64	Male	30	Temporal/R	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
42	Diagnosis	58	Female	90	Fronto-Parietal/L	Total	BD FACSCANTO II
43	Diagnosis	56	Male	90	Occipital R	Total	BD FACSCANTO II
44	Diagnosis	62	Female	80	Occipito_Temporal/L	Partial	BD FACSCANTO II
47	Diagnosis	73	Male	60	Temporal/L	Partial	BD FACSCANTO II
48	Diagnosis	31	Male	100	Other	Partial	BD FACSCANTO II

49	Diagnosis	49	Male	60	Occipital/L	Total	BD FACSCANTO II
50	Diagnosis	57	Female	70	Parieto_Temporal/R	Partial	BD FACSCANTO II
51	Diagnosis	65	Female	90	Fronto_Temporal/R	Total	BD FACSCANTO II
1	Recurrence	57	Male	90	Temporal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
2	Recurrence	67	Female	80	Temporal/L	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
3	Recurrence	51	Male	80	Temporal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
25	Recurrence	55	Female	90	Parieto_Temporal/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
26	Recurrence	48	Male	90	Frontal/L	Total	BD LSRFORTESSA X-20
38	Recurrence	42	Male	90	Frontal/L	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
39	Recurrence	49	Female	90	Fronto-Temporal/R	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
40	Recurrence	64	Male	90	Occipital/R	Total	BD LSRFORTESSA X-20
41	Recurrence	58	Female	80	Temporal/R	Partial	BD LSRFORTESSA X-20
45	Recurrence	38	Male	90	Temporal/R	Total	BD FACSCANTO II
46	Recurrence	61	Female	90	Frontal/L	Total	BD FACSCANTO II

KPS: Karnofsky performance status; R: right; L: left; L: lymphocytes; *: samples 1, 2, and 3 corresponded to diagnostic and recurrence GBM samples of the same patients. &: bilateral GBM studied at diagnosis in both the right and left tumors

SUPPLEMENTARY TABLE 2 Mutational status of *IDH1* and *IDH2* genes in 46 available GBM tumor samples

ID sample	Molecular study	
	<i>IDH1</i> mutation status	<i>IDH2</i> mutation status
1*	Wt	Wt
2	CGT>GGT; p.Arg132Gly HET	Wt
2*	Wt	Wt
3	Wt	Wt
3*	Wt	Wt
4	Wt	Wt
5	Wt	Wt
6	Wt	Wt
7	Wt	Wt
8	Wt	Wt
9	Wt	Wt
10	Wt	Wt
11	Wt	Wt
12	Wt	Wt
13	Wt	Wt
14	Wt	Wt
20	Wt	Wt
21	Wt	Wt
23	Wt	Wt
24	Wt	Wt
25	Wt	Wt
26	Wt	Wt
27	Wt	Wt
28	Wt	Wt
29	Wt	Wt
30	Wt	Wt
31	Wt	Wt
32	Wt	Wt
33	Wt	Wt
34	Wt	Wt
35	Wt	Wt
36	Wt	Wt
37	Wt	Wt
38	Wt	Wt
39	Wt	Wt
40	Wt	Wt
41	Wt	Wt
42	Wt	Wt
43	Wt	Wt
44	Wt	Wt
45	Wt	Wt
46	Wt	Wt
47	Wt	Wt
48	Wt	Wt
49	Wt	Wt
51	Wt	Wt

*: Recurrent GBM; Wt: Wild type; HET: Heterozygous mutation

SUPPLEMENTARY TABLE 3 Antibody panels, markers and reagents (clones and manufacturers) used in this study for flow cytometry immunophenotypic analyses of primary GBM tumor specimens (n=55)

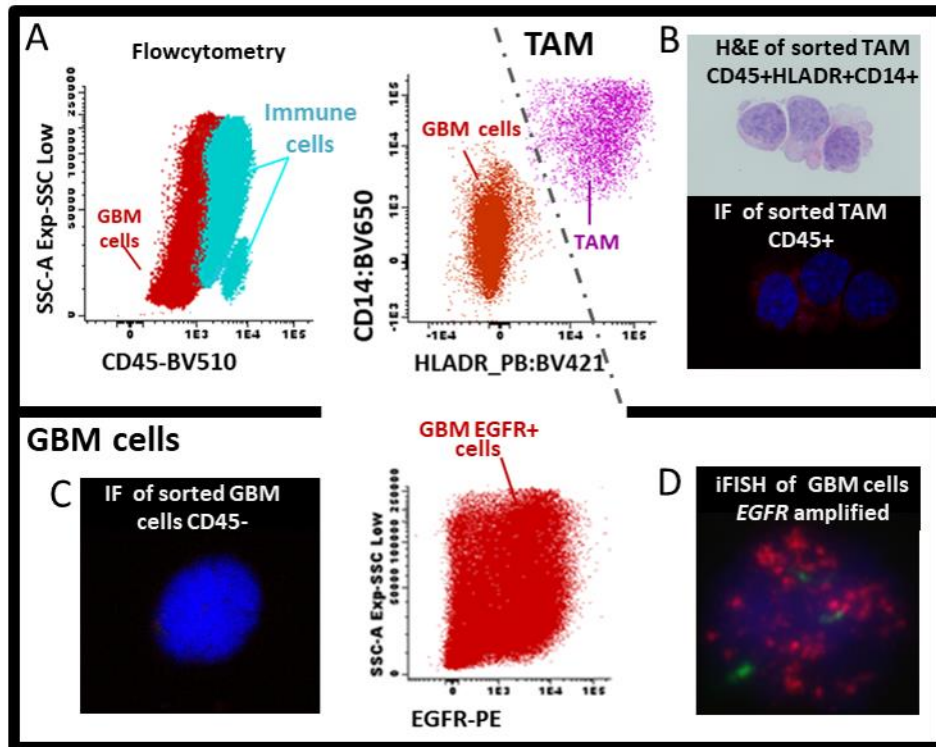
Tube	Fluorochrome panel						PerCPCy 5.5	PE	PE-CF 594
	BV421	BV510	BV650	BV711	BV786	FITC			
1 (TIL)	CD25 (M-A251) BD	CD45 OC515 (GA90) Cytognos	CD4-CD20 (SK3/2H7) BD	-	CD3 (SK7) BD	CD8-CD19 (SK1/ HIB19) BD	DRAQ5 Cytognos	IL10 JES3-19F1 BD	CD127 HIL-7R BD
2 (MDSC/ Neutrophils)	HLADR PacB (L243) Biolegend	CD45 OC515 (GA90) Cytognos	CD14 (M5E2) BD	-	CD16 (3G8) BD	CD11b (Bear1) Immunotech	DRAQ5 Cytognos	CD15 (HI98) BD	CD33 (WM53) BD
3 (TAM)	CD192 (K036C2) Biolegend	CD45 OC515 (GA90) Cytognos	CD14 (M5E2) BD	HLADR (G46-6) BD	-	CD206 (19.2) BD	DRAQ5 Cytognos	IL10 (JES3- 19F1) BD	TGF- β (TW4- 9E7) BD
4 (GBM cells)	SOX-2 V450 (O30-678) BD	CD45 OC515 (GA90) Cytognos	CD24 (ML5) BD	-	-	GFAP AF488 (1B4) BD	DRAQ5 Cytognos	CD133 (293C3) Miltenyi	CD68 (82A) BD
5 (Microglia)	CD44 (G44-26) BD	CD45 OC515 (GA90) Cytognos	CD14 (M5E2) BD	HLADR (G46-6) BD	-	GFAP AF488 (1B4) BD	DRAQ5 Cytognos	EGFR (EGFR.1) BD	CD163 (GHI/61) BD

TIL: Tumor infiltrating lymphocytes; MDSC: Myeloid-derived suppressor cells; TAM: Tumor associated macrophages; BV: Brilliant violet; BD: Becton/Dickinson Biosciences; FITC: fluorescein isothiocyanate; PE phycoerythrin; PE-CF: phycoerythrin carboxyl-fluorescein. AF: alexafluor

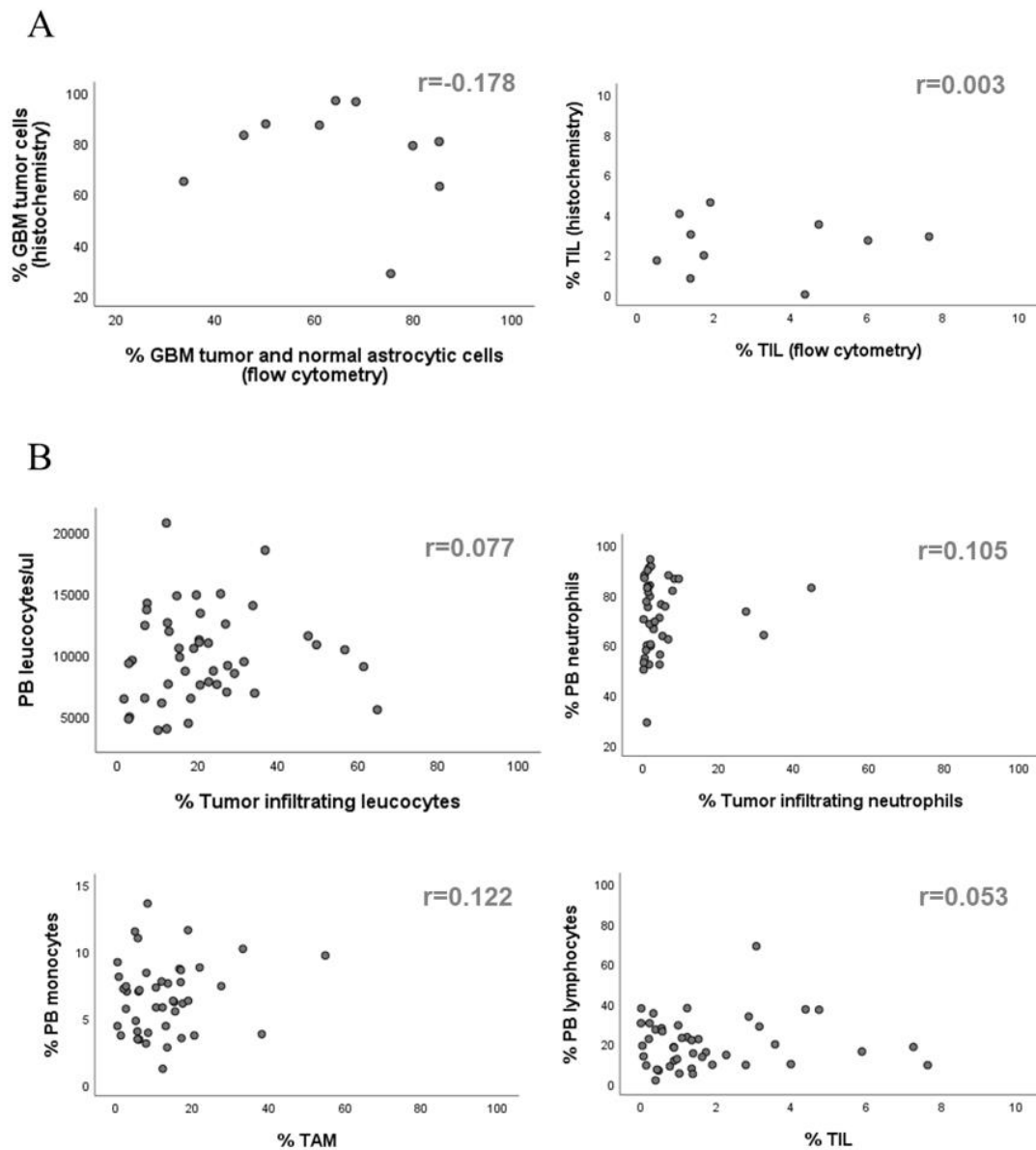
SUPPLEMENTARY TABLE 4 Distribution of different subsets of tumor cells, microglial cells and infiltrating leucocytes in paired diagnostic vs recurrent (n=2) or bilateral (n=1) tumor samples from three GBM patients

Cell populations	Tumor ID						
	GBM1		GBM2		GBM3*		
	D	R	D	R	D left	D right	R right
GBM tumor cells	26%	76%	80%	78%	26%	73%	26%
Immune cells	70%	24%	20%	12%	71%	23%	61%
Microglia	57%	9%	15%	14%	6%	5%	ND
Blood-derived macrophages	10%	7%	0.4%	8%	3%	1%	ND
Neutrophils	1%	5%	0.6%	2%	5%	3%	32%
MDSC	0.4%	5%	0.1%	1%	50%	17%	22%
TIL Total T-cell	5%	4%	0.5%	3%	12%	2%	1%
CD4 ⁺ CD8 ⁻	3%	3%	0.3%	1%	12%	2%	0.3%
CD4 ⁺ T-reg	1%	0.2%	0.04	0.1%	ND	ND	0.1%
CD4 ⁻ CD8 ⁺	1%	1%	0.2%	2%	ND	ND	0.6%
B cells	1%	0.7%	ND	0.01%	ND	ND	ND
NK cells	ND	0.2%	ND	0.01%	ND	ND	0.01%

D: diagnostic sample; R: recurrence sample; *: GBM3 corresponded to a bilateral tumor in which specimens from the right and left tumors were studied at diagnosis



SUPPLEMENTARY FIGURE 1 Immunohistochemical immunofluorescence and iFISH characterization of FACS-isolated TAM and CD45⁻ tumor and normal astrocytic cells. Immune cells were discriminated from tumor cells and other non-hematopoietic cells based on CD45 positive expression and TAM were further identified based on coexpression of CD14 and HLADR (panel A). Hematoxylin and eosin staining of FACS-sorted CD45+HLADR+CD14+ cells showed a TAM compatible morphology (panel B) and positive expression for CD45 by immunofluorescence (IF), in contrast to FACS-sorted tumor (and other non-hematopoietic) cells that were CD45⁻ (panel C). Further iFISH analyses revealed *EGFR* gene amplification associated with partial expression of EGFR by flowcytometry (panel D)



SUPPLEMENTARY FIGURE 2 Correlation between the percentage of immune cell populations in tumor tissues as assessed by flowcytometry and histochemistry (panel A) and in peripheral blood (panels B and C). In panel A, the relationship between the number of leukocytes in peripheral blood and their percentage in the tumor (upper left panel) and between the percentage of neutrophils (upper right panel), monocytes/TAM (lower left panel) and lymphocytes (upper right panel) in blood *versus* the tumor, is shown. In panel B, the correlation between the percentage of tumor cells (left panel) and TIL (right panel) in paired tumor specimens evaluated by both flow cytometry and histochemistry is displayed

Discusión

El GB es un tumor con una histopatología característica que se considera fundamental para su diagnóstico, a pesar de que proporciona información relativamente limitada sobre la evolución clínica y el pronóstico heterogéneos de los pacientes. Desde la primera edición de la clasificación de los tumores del SNC en 1979¹⁷⁷, progresivamente se han ido incorporando a la misma los avances en el conocimiento de las alteraciones genéticas y moleculares de estos tumores como complemento de sus características histológicas⁵, incluyendo información derivada de las alteraciones cromosómicas, mutaciones genéticas y de los perfiles de expresión génica, e incluso datos epigenéticos/epigenómicos. Todo ello ha incrementado de forma notable la complejidad de la clasificación actual de los GB, si bien su impacto pronóstico sigue siendo relativamente limitado^{45, 59, 178–183}.

Entre todas las alteraciones genéticas descritas en GB, la amplificación génica es una de las alteraciones más frecuentes, involucrando habitualmente genes con potencial oncogénico, es decir, capaces de contribuir a la transformación de células normales en células malignas, al desarrollar un papel clave en vías de señalización celular relacionadas con la proliferación celular, la muerte celular por apoptosis, la angiogénesis, o el bloqueo de la diferenciación celular. En este trabajo nos planteamos como primer objetivo analizar el perfil de amplificación génica del genoma de los GB. La existencia de amplificación génica y/o de otras mutaciones y alteraciones genéticas a nivel de ADN se traduce en la generación de ARNm y/o perfiles de expresión de ARNm alterados con una producción y/o generación de proteínas truncadas disfuncionales. Nuestro segundo objetivo se centró en el estudio del GEP de aquellos genes que se encuentran amplificados con mayor frecuencia en los GB, distinguiendo, dentro de ellos,

las amplificaciones asociadas a variantes mutadas del gen; y conocer su posible relación con el patrón de CNA de estos genes y la supervivencia de los pacientes, aspecto que está poco explorado y con resultados contradictorios en la bibliografía^{52, 62, 184}.

Por otra parte, hoy sabemos que el comportamiento de los tumores, incluidos los GB, depende no solo de las alteraciones genómicas y epigenómicas de las células tumorales, sino también de las interacciones que estas establecen entre sí y con células del microambiente tumoral, en especial, las células del sistema inmune, generando un microambiente específico inmunosupresor¹¹³. El hecho de que una alteración genética pueda tener trascendencia y consecuencias sobre el microambiente tumoral, afectando a la interacción y función de los elementos celulares que lo constituyen, es un aspecto poco estudiado en los GB. Precisamente, el tercer objetivo de este trabajo doctoral se centró en la caracterización y cuantificación de las células que conforman el microambiente inmune de los GB, empleando la técnica de citometría de flujo multiparamétrica.

A continuación, en este apartado de la memoria de esta tesis doctoral, discutiremos de forma separada y general los resultados obtenidos en relación con cada uno de los tres objetivos planteados al inicio del trabajo.

1. Amplificaciones y/o deleciones génicas características de los GB y su utilidad en relación con el pronóstico de la enfermedad.

La amplificación génica constituye uno de los mecanismos (de alteración) más comunes en el GB, y en particular, la amplificación del gen *EGFR* codificado en el cromosoma 7^{44, 185}. Así, en un número significativo de pacientes diagnosticados de GB,

la amplificación de *EGFR* se ha descrito de forma aislada o asociada a la amplificación de un número variable de genes localizados en otras regiones cromosómicas. Sin embargo, el impacto que estos perfiles de amplificación génica puedan tener en la supervivencia global de los pacientes no había sido motivo de análisis en los estudios realizados de forma previa a este trabajo doctoral.

Nuestro primer objetivo se centró en investigar los perfiles de amplificación génica de los GB y su impacto en la supervivencia global de una serie amplia de pacientes. Para ello, seleccionamos una técnica de *arrays* de SNPs de alta densidad, que permitían la identificación de CNA existentes a lo largo de todo el genoma del tumor de forma muy sensible y a la vez permitían la identificación específica y detallada de los genes amplificados. Con el propósito de evitar la identificación errónea de CNA (inserciones y deleciones) debidas a polimorfismos germinales característicos de cada nucleótido, de cada paciente analizamos muestras pareadas de tumor y de sangre periférica (SP), en las que asumimos no se encontraban las alteraciones típicas del tumor.

En general, nuestros resultados mostraron la presencia de amplificación genética en una elevada proporción de los tumores investigados; tal como sería de esperar, la región cromosómica que se encontraba amplificada con mayor frecuencia fue la región 7p11.2 en el brazo corto del cromosoma 7, seguida de la amplificación de las regiones 12q, 4q12 y 1q32.1 y en menor grado también, de la amplificación de distintas regiones a nivel de los cromosomas 1q, 5q, 6q, 7q y ambos brazos de los cromosomas 11 o 17. Estos resultados confirman y amplían hallazgos previos de nuestro grupo^{22, 41, 44} y de otros grupos^{186, 187}, que indican que *EGFR*, en la región 7p11.2 es el oncogén amplificado

con más frecuencia en GB, ya que se encuentra alterado en hasta el 40% de los GB entre los que se asoció además con un mejor pronóstico, en comparación con los GB que no mostraban amplificación de este (u otros) genes^{44, 188}. De acuerdo también con observaciones previas^{185, 189, 190}, en nuestro estudio, la región cromosómica 7p11.2, se encontraba amplificada, bien de forma aislada, bien en asociación con la amplificación de secuencias de ADN de otras regiones cromosómicas, afectando a su vez con frecuencia a varios genes.

En la actualidad, está bien establecido que la activación del gen *EGFR* regula positivamente las vías de señalización RAS/RAF/MAPK y PI3K, y que su amplificación a nivel de ADN y/o a través de las mutaciones que le afectan, inducen un incremento descontrolado de dicha señalización, traducándose en un fenotipo tumoral asociado a proliferación celular anormalmente elevada, mayor supervivencia de las células tumorales y un aumento de la angiogénesis^{185, 191}. Es preciso destacar que en nuestra serie, mediante el mapeo genético de la región amplificada en el cromosoma 7p11.2, pudimos confirmar que esta alteración, además de afectar al gen *EGFR*, incluía también con relativa frecuencia el gen *LANCL2*, además de otros genes adyacentes a los genes *EGFR* y *LANCL2*^{44, 192}. El gen *LANCL2* codifica una proteína implicada en la regulación positiva de AKT, la supervivencia celular, y una mayor sensibilidad celular a la adriamicina¹⁹³, un fármaco que se utiliza en la quimioterapia del cáncer, cuyo mecanismo de acción sigue sin conocerse de forma precisa. La amplificación de otras regiones cromosómicas como las regiones 12q, 4q y 1q, al igual que la región 7p11.2, también involucra cada una de ellas a varios genes¹⁹⁴. Dentro de los genes afectados por la amplificación de las secuencias de ADN de la región cromosómica 12q13-14 amplificada, se incluían habitualmente el gen *CDK4*, junto con los genes *METTL1*,

CYP27B1, *AVIL*, *CTDSP2*, *METT21B*, *AGAP2* y *OS9*. A su vez, la amplificación genética observada a nivel del cromosoma 12q15, presente en una fracción significativa de todos los GB analizados, afectaba al oncogén *MDM2*. Todos estos genes desarrollan funciones importantes, entre las que destaca *CDK4*, que codifica para un miembro de la familia de las proteínas Ser/Thr quinasas, necesario para la transición de la fase G1 del ciclo celular a la fase S¹⁹⁵; tal como ha sido referido anteriormente en este trabajo, *CDK4* fosforila el producto del gen *Rb*, inactivándolo y provocando la liberación de proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular, al mismo tiempo que regula negativamente a *TP53*¹⁹⁵. A su vez, *AVIL* codifica una proteína que se une a la actina y promueve el desarrollo de células neuronales, mientras que el gen *MDM2* codifica una ligasa de ubiquitina E3 localizada en el núcleo, cuya transcripción se reconoce como el principal regulador negativo de *TP53*¹⁹⁶. En nuestra serie, la amplificación genética en la región cromosómica 4q11-12 afectó sistemáticamente al gen *PDGFRA*, junto con los genes *SCFD2* y *FIP1L1*. El gen *PDGFRA*¹⁸⁵, codifica un receptor de superficie celular con actividad tirosina-quinasa que promueve la proliferación y migración celular. Finalmente, la amplificación de secuencias de ADN a nivel del cromosoma 1q32.1 involucraba al gen *MDM4*, junto con los genes *SOX13*, *ETNK2*, *KISS1*, *GOLT1A*, *PLEKHA6*, *REN* y *PIK3C2B*. *MDM4* inhibe *TP53* y *TP73*, deteniendo el ciclo celular mediante la unión a su dominio de activación transcripcional, al mismo tiempo que inhibe la degradación de *MDM2*¹⁹⁶; a su vez, *PIK3C2B* pertenece a la familia de genes *PI3K* y activa vías de señalización requeridas para la proliferación, supervivencia y migración celular¹⁹⁷. El patrón de amplificación combinada de varios genes en distintas regiones cromosómicas podría conducir a perfiles de transformación maligna únicos, para los cuales, los mecanismos subyacentes implicados aún no se conocen de forma precisa.

Independientemente de los mecanismos involucrados, en nuestra serie, la amplificación aislada de secuencias de ADN en regiones cromosómicas distintas de 7p11.2 se asoció en los pacientes con GB, con una supervivencia global significativamente más corta.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que los distintos perfiles de amplificación génica encontrados en los GB confieren un comportamiento clínico y biológico único, y diferente del observado en los demás pacientes. Con el fin de confirmar esta hipótesis, en nuestro trabajo pudimos definir cinco perfiles diferentes de amplificación génica, basándonos en la presencia vs ausencia y el tipo de amplificación génica, que entre nuestros pacientes diagnosticados de GB mostraban una asociación significativa con la supervivencia global. Estos perfiles incluían: i) GB sin amplificación génica; ii) GB con amplificación exclusivamente de la región 7p11.2 y con *EGFR* afectado; iii) GB con amplificación genética de 7p 11.2 junto con la amplificación de otras regiones cromosómicas distintas de la región 7p11.2; iv) GB con amplificación génica de una sola región cromosómica diferente de la región 7p11.2; y, v) GB con amplificaciones genéticas de múltiples regiones cromosómicas, entre las que no se incluye la región 7p11.2, ni el gen *EGFR*. Desde el punto de vista pronóstico, estos cinco perfiles de amplificación génica podrían reagruparse en dos grupos principales: i) pacientes sin amplificación génica o con amplificación/amplificaciones que incluyan la región de 7p11.2 y el gen *EGFR*, con una supervivencia global significativamente más prolongada; y, ii) GB que presentan amplificación de una o más regiones cromosómicas, entre las que no se incluye la amplificación del gen *EGFR*, y que se asocian con un peor pronóstico. El impacto pronóstico de esta segunda clasificación se validó en una cohorte más amplia de pacientes con GB, previamente referidos en distintas publicaciones científicas, constituyendo esta clasificación, junto con el tipo de tratamiento administrado, la

combinación de factores pronósticos independientes que mejor predecía la evolución clínica y la supervivencia global de los pacientes con GB. Queda ahora por dilucidar cuáles son los mecanismos exactos que determinan esta asociación entre los distintos perfiles de amplificación genética encontrados y la supervivencia de los pacientes con un GB. Independientemente de los mecanismos implicados, este hallazgo tiene en sí mismo un importante impacto clínico debido a que, a pesar de que se hayan propuesto previamente varios modelos de clasificación de los GB basados en su heterogeneidad genómica⁵⁸⁻⁶⁰, y que incluso se hayan identificado tumores con diferentes orígenes celulares, hasta ahora, estos modelos de clasificación han demostrado tener un valor pronóstico limitado^{179, 180, 198, 199} y/o son de difícil aplicación en la rutina diagnóstica, debido a la complejidad de la información requerida en el momento del diagnóstico. Por el contrario, el nuevo modelo de estratificación pronóstica de los GB recogido en este trabajo constituye un modelo relativamente simple, basado únicamente en el perfil de amplificación genética del tumor, susceptible de ser implementado fácilmente en la rutina diagnóstica y contribuir así a un mejor manejo de los pacientes con GB.

2. Perfil de expresión de los genes más frecuentemente amplificados en GB y su impacto clínico.

En el momento de iniciar este trabajo, no existía ningún estudio en el que se analizaran simultáneamente el GEP junto con las alteraciones genéticas más habituales de los GB, incluidos los perfiles de amplificación génica. Por ello, nuestro segundo objetivo se centró en investigar por primera vez el perfil de expresión génica de cuatro genes (*EGFR*, *CDK4*, *MDM4* y *PDGFRA*), que se encuentran amplificados a nivel de ADN

con frecuencia en GB²⁰⁰, y conocer la posible asociación entre ambos y su impacto en la evolución de la enfermedad.

En términos globales, nuestros resultados mostraron unos GEP para los cuatro genes investigados muy variables, observándose sobreexpresión de uno o más de estos cuatro genes respecto al tejido cerebral normal en prácticamente todos los GB. De los cuatro genes, el gen *CDK4* fue el que se encontraba sobreexpresado con mayor frecuencia, seguido de *EGFR* y *PDGFRA*, mientras que *MDM4* solo se encontraba sobreexpresado en menos de la mitad de los tumores. No obstante, entre los GB en los que se detectó sobreexpresión simultánea de los cuatro genes, *EGFR* era de todos ellos el gen que presentaba mayores niveles de sobreexpresión respecto al tejido cerebral normal. Estos resultados se confirmaron en una serie de validación de 264 GB y, están de acuerdo con los publicados previamente en series más limitadas de pacientes, en las que se ha demostrado la existencia de GEP alterados y muy heterogéneos en muestras tumorales de pacientes con GB.

En los últimos años, se han incrementado y acumulado evidencias que sugieren que la amplificación del gen *EGFR* y de otros genes amplificados a nivel genético en GB, podrían desempeñar un papel clave en la generación, el desarrollo y comportamiento clínico de estos tumores^{44, 201, 202}. Sin embargo, si exceptuamos un estudio reciente²⁰³, hasta la fecha no se ha podido identificar en la bibliografía una asociación clara entre las alteraciones genéticas y el GEP de genes concretos en GB²⁰⁴. El análisis simultáneo del GEP y las alteraciones de los genes *EGFR*, *CDK4*, *MDM4* y *PDGFRA*, realizado en nuestros pacientes, reveló la existencia tanto de amplificación genética como de sobreexpresión de cada uno de los cuatro genes estudiados en una proporción variable de tumores. Tal

como sería de esperar, con frecuencia los GB que mostraban sobreexpresión de *EGFR* y de *MDM4* mostraban también amplificación de estos genes a nivel de ADN, si bien en un número importante de tumores observamos sobreexpresión de ambos genes en ausencia de la correspondiente amplificación génica. Por el contrario, aunque existía una cierta tendencia, no observamos una asociación significativa entre la sobreexpresión a nivel de ARNm y la amplificación genética a nivel de ADN para los genes *CDK4* y *PDGFRA*. En conjunto, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de uno o más de los cuatro genes investigados (*EGFR*, *CDK4*, *MDM4* y *PDGFRA*) a nivel de ARNm es también una característica distintiva de los GB, que no puede explicarse completamente por la existencia de la amplificación a nivel genético de los genes correspondientes, incluso en el caso de *EGFR*, cuando se consideran las ganancias del cromosoma 7. Con base en estos resultados, investigamos a continuación el posible impacto de otras alteraciones genéticas, como deleciones/mutaciones intragénicas, que se observan con frecuencia en los genes *EGFR* y *PDGFRA*. De acuerdo con datos previos, nuestros resultados mostraron que *EGFR* es el gen que con mayor frecuencia aparece mutado (p.ej. por deleciones intragénicas) en GB^{201, 202, 205}. Cabe señalar que la mayoría de los casos que mostraban deleciones intragénicas de *EGFR* presentaba la variante *EGFRvIII* sola, o en combinación con otras variantes (deleciones) del gen *EGFR*, en asociación con la amplificación del gen *EGFR* a nivel de ADN y la sobreexpresión del ARNm de *EGFR*. En la actualidad, se plantean varios mecanismos que pueden estar relacionados con la sobreexpresión de *EGFR* en GB que presentan mutaciones de este gen. Estos incluyen deleciones tanto en la fracción amino terminal, como carboxilo terminal del gen, además de deleciones de otros exones, que en común conducen a la formación de proteínas *EGFR* oncogénicas que mantienen una conformación activa sin

depender de la unión del ligando para su activación. Precisamente, la activación constitutiva de EGFR tiene impacto también en el nivel de expresión del ARNm de otros genes. Además de las deleciones intragénicas de *EGFR*, en nuestra serie solo encontramos mutaciones/deleciones del gen *PDGFRA* en un pequeño grupo de tumores sin alteraciones (mutación/delección) de los genes *CDK4* y *MDM4*. Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de las deleciones intragénicas en pacientes que presentan amplificación del gen *EGFR*, ya que la interacción entre la delección de los exones 2 al 7 de *EGFR* de la variante *EGFRvIII*, junto a la amplificación del gen *EGFR* conduce, de forma sistemática, a la activación constitutiva de la vía de señalización de PI3K-AKT, lo que en última instancia podría contribuir a explicar la transformación maligna en los GB²⁰⁶, tal como han sugerido previamente otros autores^{201, 205}. En este sentido, la estrecha asociación encontrada en nuestra serie entre la presencia de la variante *EGFRvIII*, la existencia de amplificación a nivel de ADN y la sobreexpresión de EGFR a nivel de ARNm, confirma datos preliminares de otros autores^{201, 207}, aunque cabe la posibilidad de que al menos, en algunos pacientes no exista alteración bi-alélica del gen *EGFR*. Sin embargo, nuestros resultados también demuestran que las mutaciones/deleciones de *EGFR* en homo o heterocigosidad (ni solas ni en combinación con la amplificación del gen *EGFR*) pueden explicar completamente la sobreexpresión del gen *EGFR* observada en algunos casos en ausencia de ninguna de las alteraciones genéticas referidas. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que, a pesar de que la sobreexpresión de *EGFR*, y también de *PDGFRA*, *CDK4* y/o *MDM4*, es una característica habitual y compartida por los GB, el aumento de la expresión de estos genes no puede explicarse completamente por la existencia de una amplificación subyacente y/o de mutaciones/deleciones de estos genes, existiendo probablemente en estos casos otros mecanismos que conduzcan a su

sobreexpresión y activación. En este sentido, estudios previos han sugerido que la desregulación de EGFR podría estar asociada (p.ej. ser inducida) a la expresión descontrolada de otros genes y, en especial, de genes que involucran las vías de señalización de PI3-quinasa y AKT, como *CDK4*, conduciendo a una proliferación y supervivencia celular alteradas. De acuerdo con esta hipótesis, Liu *et al.*³⁴ han demostrado recientemente en GB, una actividad anti-tumoral sinérgica de los inhibidores de EGFR y CDK4.

A pesar de todo lo anterior, en este estudio no encontramos una asociación clara entre el perfil de expresión de los genes *EGFR*, *CDK4*, *MDM4* y *PDGFRA* y/o las alteraciones genómicas subyacentes de estos cuatro genes, y la supervivencia global de los pacientes con GB, ni cuando consideramos el GEP de los cuatro genes por separado, ni cuando se investigaron de forma combinada. Estos resultados contrastan con los obtenidos en estudios previos en los que se ha encontrado una asociación entre la sobreexpresión de EGFR y el comportamiento clínico del tumor^{208, 209}, y entre la existencia de amplificación de *EGFR* y la supervivencia de pacientes con GB^{210, 211}. Sin embargo, mientras que en algunas series la sobreexpresión y/o amplificación de *EGFR* se ha asociado con un peor pronóstico²¹², en otras constituye un factor pronóstico favorable^{188, 213}. Por el contrario, nuestros resultados no muestran una correlación clara con la evolución y pronóstico de la enfermedad^{52, 201}.

3. Diseño e implementación de una técnica de CMF para la identificación y caracterización detallada de la composición celular y el microambiente inmune de los GB, y su relación con las alteraciones genómicas y el pronóstico de la enfermedad.

Los estudios histológicos convencionales, incluidos análisis IHQ, constituyen el pilar básico empleado durante décadas para el diagnóstico y clasificación de los gliomas. Sin embargo, este tipo de técnicas, aunque permiten distinguir entre células neoplásicas y las células del estroma y del medioambiente tumoral, incluidos los leucocitos presentes en el tumor, no permiten una caracterización detallada y, con frecuencia, simultánea de las mismas, debido a la incompatibilidad de llevar a cabo marcajes simultáneos con dos o más anticuerpos/marcadores.

En el presente trabajo doctoral diseñamos un panel amplio de marcadores, con el objetivo de realizar una caracterización fenotípica detallada de las diferentes poblaciones de células neoplásicas e inmunes que coexisten en el tejido tumoral de GB, empleando citometría de flujo multiparamétrica.

De acuerdo con estudios previos en GB y en otros tumores cerebrales¹³⁵, nuestros resultados confirmaron la presencia sistemática de infiltrados de células inmunes junto con las células tumorales de GB, aunque su proporción variaba sustancialmente entre los distintos tumores analizados. Desde el punto de vista práctico, el marcaje combinado con los marcadores GFAP y CD45 permitió discriminar, por un lado, entre células tumorales y células astrocíticas normales GFAP⁺CD45⁻, y por otro, las células inmunes derivadas de sangre GFAP⁻CD45⁺ de acuerdo con hallazgos previos de otros autores^{175, 214}. A pesar de que GFAP también se expresa en astrocitos normales²¹⁵ y, por lo tanto, no es un marcador específico de las células tumorales de los GB, el marcaje simultáneo con GFAP y CD45 permitía la identificación inequívoca de las células inmunes que infiltraban cada tumor, incluso cuando el tejido tumoral estaba constituido de forma casi exclusiva por células gliomatosas. Entre las células tumorales del GB (y las células

astrocíticas normales), se identificaron además dos subpoblaciones celulares principales en función de la presencia o ausencia de expresión de SOX2: una población celular SOX2⁻ (fenotípicamente correspondientes a células tumorales más maduras), y una fracción menos representada de células (fenotípicamente más inmaduras) SOX2⁺. Dentro de la fracción de células SOX2⁺, un conjunto de células tumorales mostró positividad para el marcador CD133, característico de células madre gliomatosas (CSCs, del inglés *cancer stem cells*). En este contexto, en varios estudios se ha demostrado que CD133 constituye uno de los marcadores más fiables para la identificación de las CSCs del GB, que a su vez expresan también SOX2^{216, 217}. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los estudios previos en los que se ha investigado específicamente la expresión de SOX2 en GB, se han determinado dentro de la población de células CD133⁺, mientras que no proporcionan información sobre su expresión en células tumorales CD133⁻²¹⁸. En contraposición con estos trabajos, nuestros resultados demuestran la existencia tanto de coexpresión de SOX2 en células tumorales CD133⁺, como de una fracción significativa de células tumorales SOX2⁺CD133⁻GFAP⁺. En conjunto, estos hallazgos sugieren que, mientras que la población minoritaria de células tumorales CD133⁺SOX2⁺, representadas en diferentes porcentajes en cada tumor, podría contener CSCs, queda de momento por determinar el posible significado biológico y relevancia clínica de estas células tumorales CD133⁺SOX2⁺, y de la población de células SOX2⁺CD133⁻.

De forma similar a lo comentado anteriormente respecto a los marcadores CD133 y SOX2, en el presente trabajo encontramos también porcentajes variables de células tumorales que expresaban otros marcadores, como la proteína EGFR y las moléculas de adhesión CD24 y CD44, que se sabe son positivas en células tumorales de GB²¹⁹. Estos hallazgos, además de reforzar aún más si cabe hallazgos previos sobre la existencia de

una gran heterogeneidad fenotípica entre las células tumorales de los GB, demuestran también una asociación evidente entre algunas alteraciones genéticas concretas y determinados perfiles de expresión de proteínas²²⁰, tal como se confirma aquí para los niveles de expresión de la proteína EGFR y el estado del gen *EGFR*. A pesar de todo lo anteriormente expuesto, en nuestros pacientes no pudimos demostrar la existencia de una asociación clara entre los perfiles de expresión de los distintos marcadores proteicos de las células de GB y las características del paciente al diagnóstico, o la posterior evolución de la enfermedad.

Con respecto a las células inmunes presentes en las muestras tumorales analizadas en nuestra serie, observamos también niveles muy variables de leucocitos infiltrantes en el tumor. En términos generales, estos infiltrados inmunes consistían en diferentes proporciones de distintos tipos de células inmunes, entre las que predominaban las células de línea mieloide sobre las células linfoides, de acuerdo con hallazgos previos referidos en la bibliografía¹⁷¹. Entre las células mieloides predominaron las células de la microglía y los TAM derivados de la sangre, aunque encontramos también pequeños porcentajes de granulocitos neutrófilos, MDSC y, en menor medida, linfocitos (linfocitos T y, en menor frecuencia aún linfocitos B y células NK). En nuestro conocimiento, este sería el primer estudio en el que se evaluaron, simultáneamente, todas las poblaciones de células inmunes antes referidas, analizadas mediante citometría de flujo empleando un panel amplio de anticuerpos (24 anticuerpos en total), sobre un número relativamente elevado de pacientes con GB^{221, 222}. En estudios previos realizados con modelos murinos y tumores primarios humanos, las células de la microglía se han definido de acuerdo con la expresión de marcadores mieloides como CD11b y de CD45²²³. Sin embargo, en nuestro estudio, estos marcadores por sí solos fueron

insuficientes para la identificación de las células de la microglía y su discriminación de otras poblaciones de células mieloides incluidas dentro de los leucocitos que infiltraban el tumor²¹⁴. Por lo tanto, fueron necesarios otros marcadores como CD14, HLADR y CD15, además de los niveles de autofluorescencia verde (GAFL, del inglés, “*green autofluorescence*”), para discriminar entre las distintas poblaciones de TAM, p.ej., las células de la microglía y los macrófagos derivados de médula ósea, además de los granulocitos neutrófilos y las MDSC. La tinción simultánea con CD15, CD16 y CD11b, además de HLA-DR y CD14, permitió discriminar de forma inequívoca entre los TAM CD14⁺HLADR⁺ (incluyendo las células de la microglía y los macrófagos derivados de sangre), los granulocitos neutrófilos CD15^{fuerte}CD16^{fuerte}CD11b⁺HLADR⁻CD14⁻ y las MDSC, CD15⁺CD16⁻CD11b⁺HLADR^{-/débil}¹⁷¹. Además incluimos marcadores convencionales adicionales^{132, 150, 224} para la discriminación, dentro de las células linfoides CD45^{fuerte}, de las células TCD3⁺ (y sus subpoblaciones mayoritarias TCD4⁺, TCD8⁺ y TCD4⁺CD8⁺), las Tregs CD4⁺CD25^{fuerte}, los linfocitos B CD19⁺CD20⁺, y las células NK SSC^{bajo}CD16⁺. En términos generales, de todos los leucocitos que infiltraban el tumor, los TAM fueron la población celular más representada, incluyendo células de la microglía y, en menor porcentaje también, los macrófagos derivados de la sangre. Estudios previos en pacientes con GB han sugerido que el predominio, dentro de los TAM, de macrófagos de tipo M1 sobre los macrófagos de tipo M2 podría estar asociado con una mejor evolución del paciente, mientras que niveles más elevados de TAM de tipo M2 podrían estar relacionados con un mayor grado de crecimiento y progresión tumoral¹⁵⁵. En este trabajo, investigamos el patrón de expresión de tres marcadores (CD192, CD206 y CD163), que se han relacionado con estos dos estados de polarización de los TAM a macrófagos de tipo M1 vs M2^{110, 155}. A pesar de que se observaron perfiles de expresión

variables y heterogéneos para cada uno de los tres marcadores, pudimos discriminar entre los TAM de tipo M1, en función de la expresión de CD192, y los macrófagos de tipo M2 con positividad para CD163 y/o CD206. Siguiendo estos criterios, identificamos una proporción global de TAM M1 y M2 similar, sin que estos análisis pusieran de relieve la existencia de subgrupos de tumor bien definidos según el predominio de TAM de tipo M1 o de tipo M2. A su vez, las poblaciones de granulocitos neutrófilos y de MDSC se encontraron en proporciones similares, aunque inferiores a las de los TAM y más variables, constituyendo los linfocitos habitualmente menos del 10% de todos los leucocitos que infiltraban el tejido tumoral, pero en porcentajes también muy variables entre diferentes tumores. Un análisis más detallado de los linfocitos infiltrantes del tumor en nuestros GB mostró un claro predominio de células T y, particularmente, de células TCD8⁺, seguidas en menor frecuencia por células TCD4⁺ y TCD4⁺CD8⁻, en número claramente superior al de las células Tregs, linfocitos B y células NK, respectivamente. En general, estos resultados confirman y amplían hallazgos previos de otros autores que únicamente habían evaluado algunas poblaciones de leucocitos de entre todas las analizadas en nuestra serie^{118, 132}.

Por otra parte, la evaluación simultánea de todas las distintas subpoblaciones de células tumorales y células inmunes presentes en cada uno de los GB analizados empleando análisis multivariados, mostró la existencia de tres perfiles diferentes de infiltrado tumoral por células inmunes. Estos incluían: i) un grupo numeroso de GB, con escaso infiltrado de células inmunes; ii) tumores con predominio de células mieloides (TAM y neutrófilos), junto con porcentajes mínimos residuales de linfocitos, particularmente de linfocitos T; y iii) un grupo más pequeño de tumores con infiltrados de células inmunes, que consistían en una mezcla de TAM, granulocitos neutrófilos y

linfocitos T, principalmente células TCD8⁺ y en menor medida TCD4⁺. En la actualidad, existe un número muy limitado de trabajos en los que se han evaluado simultáneamente y en series amplias de pacientes diagnosticados de GB, múltiples poblaciones de leucocitos infiltrantes del tumor^{118, 225}. A pesar de esto, Zhang et al²²⁶ han investigado recientemente los perfiles inmunes del GB basados en GEP. Mediante esta estrategia, Zhang *et al.*²²⁶ identificaron tres perfiles inmunes (microambientes) diferentes, incluyendo un perfil de expresión génica relacionado con los TAM y pacientes que presentaban una mejor evolución clínica. Aunque no se puede establecer una correlación directa entre nuestros resultados y el GEP definido por Zhang *et al.*, en nuestra serie, aquellos pacientes en cuyos tumores se detectó infiltración inmune con predominio de TAM, mostraron también (junto con los que presentaban niveles mínimos de infiltrado inmune) una mayor supervivencia respecto a los pacientes que mostraban infiltrados mixtos de TAM, granulocitos neutrófilos y linfocitos. Estudios previos en gliomas sugieren que, tanto el predominio de TAM sobre otras poblaciones de células inmunes²²⁷, como la presencia de infiltrados tumorales enriquecidos en granulocitos neutrófilos y MDSC, se asocian con características típicas de un peor pronóstico de la enfermedad^{114, 228}, lo que se ha sugerido pudiera ser debido a los efectos inhibidores de estas células mieloides sobre las células T, y su contribución a la generación de a un microambiente tumoral inmunosupresor²²⁹. Por lo tanto, en los gliomas, un mayor grado de infiltración tumoral por granulocitos neutrófilos²³⁰ y MDSC²²⁹ se ha correlacionado con un mayor grado histopatológico del tumor. Por el contrario, la presencia de linfocitos en el infiltrado inmune del tumor, y en particular de células TCD8⁺, se ha asociado en algunos estudios con una mayor supervivencia¹³². Sin embargo, en este ámbito se han referido resultados contradictorios, habiéndose

encontrado en algunos estudios recientes, una asociación entre niveles más elevados de células inmunes TCD3⁺ y TCD8⁺ en el infiltrado tumoral, y una supervivencia significativamente más corta¹¹⁸. Estas aparentes discrepancias pueden deberse al hecho de que la evolución del tumor podría no estar directamente relacionada con la proporción concreta de TAM, linfocitos TCD4⁺, o TCD8⁺ *per se*, sino que es más probable que esté asociada con el perfil inmunológico general de los leucocitos que infiltran el tumor²³¹. De acuerdo con esta hipótesis, en nuestro trabajo no encontramos ninguna asociación significativa entre el porcentaje global de TAM, de granulocitos neutrófilos, de MDSC o de células T, y la evolución del paciente. Por el contrario, un perfil de células inmunes único, basado en una mezcla de TAM, neutrófilos y recuentos de linfocitos T relativamente elevados, se asoció de forma significativa con una supervivencia global más corta. A su vez, a pesar de la posible relevancia clínica de las células NK y las células Tregs, ninguna de estas dos poblaciones celulares, mínimamente representadas en el infiltrado inmune del tumor, mostró un impacto claro en el comportamiento clínico y pronóstico de la enfermedad ¹⁵².

Estudios previos han identificado que tanto el sexo¹¹⁸, como la edad¹³² de los pacientes, su estado general (el índice de Karnofsky; KPS)²³², el tipo de cirugía realizada²³³, y de tratamiento administrado²³⁴, además de las alteraciones genéticas (p. ej. estado del gen *EGFR*)^{200, 235} y epigenéticas (metilación de *MGMT* del tumor)¹³, se asocian de forma significativa con la evolución clínica y la supervivencia global de los pacientes con GB. Por el contrario, solo unos pocos estudios han investigado el impacto del microambiente tumoral, incluida la composición inmune del tumor en el pronóstico de los pacientes diagnosticados de GB. En nuestros pacientes no observamos ninguna asociación evidente entre el perfil de células inmunitarias que infiltraba el tumor y

distintas características clínicas y demográficas de los pacientes, como su estado general, reflejado en el KPS, la edad, el sexo o el tipo de cirugía realizada. Por el contrario, observamos una asociación significativa entre la composición celular del infiltrado inmune del tumor y el estado del gen *EGFR*. Desde hace tiempo se sabe, que el gen *EGFR* está alterado en la mayoría de los pacientes con GB, en los que desempeña un papel clave en la generación del tumor y en su comportamiento clínico y evolutivo^{201, 235}. Así, se ha descrito previamente en la bibliografía la presencia de un elevado porcentaje GB con alteraciones en el número de copias del cromosoma 7 (es decir, trisomías y polisomías asociadas o no con amplificación del gen *EGFR*), asociado a amplificación del gen *EGFR*, que oscila entre el 30% y 70% de todos los tumores, dependiendo de las técnicas utilizadas para su detección y estudio; además, hasta el 90% de los GB que no presentan amplificación de *EGFR* podrían tener alteraciones numéricas del cromosoma 7^{23, 220}, tal como se ha descrito en este trabajo. A pesar de todo ello, hasta la fecha son pocos los estudios en los que se haya investigado la posible relación existente entre las alteraciones del gen *EGFR* y el perfil inmune de los GB. A modo de ejemplo, An et al²³⁶, han demostrado que la presencia de *EGFR* silvestre y algunas mutaciones de *EGFR* como *EGFRvIII*, cooperan para inducir la quimiotaxis e infiltración del tejido tumoral por macrófagos. A su vez, Hao et al.²³⁷ encontraron niveles más elevados de linfocitos TCD4⁺, granulocitos neutrófilos y células dendríticas en el infiltrado tumoral de pacientes que presentaban mutación de *EGFR*, asociándose este perfil en gliomas de bajo grado, con una supervivencia más corta. En nuestra serie, la amplificación de *EGFR* se asoció con un infiltrado inmune muy limitado, mientras que las ganancias de *EGFR* predominaron entre los tumores que mostraban mayor proporción de TAM y granulocitos neutrófilos en el infiltrado inmune, y un estado del

gen *EGFR* diploide fue muy característico de tumores con infiltración mixta de células mieloides y linfocitos T. Estos resultados están en línea con estudios previos en los que se ha encontrado una asociación significativa entre la amplificación del gen *EGFR* y una mejor evolución del paciente²³⁵, poniendo de manifiesto la posible existencia de un vínculo entre los perfiles genético e inmunitario de estos tumores.

En resumen, en este trabajo demostramos la existencia sistemática de infiltrados de células inmunes en los GB, aunque con distintos perfiles, asociándose la presencia de infiltrados mixtos de células mieloides (TAM y granulocitos neutrófilos) y linfoides (linfocitos T), con la ausencia de alteraciones genéticas de *EGFR* y una supervivencia global significativamente más corta.

Conclusiones

En relación con el primer objetivo, centrado en la identificación de las amplificaciones génicas presentes en todo el genoma de los GB y la determinación de su frecuencia y utilidad en la estratificación pronóstica de los pacientes:

1. El análisis de los perfiles de amplificación génica de los GB mostró perfiles heterogéneos y complejos, siendo las amplificaciones de las regiones cromosómicas 7, 12, 1 y 4 que contienen los genes *EGFR*, *CDK4*, *MDM4* y *PDGFRA* las más habituales.
2. De acuerdo con los perfiles de amplificación génica encontrados, los GB se agrupan en: i) GB sin amplificación génica; ii) GB con amplificación génica restringida a la región 7p11.2 y con *EGFR* amplificado; iii) GB con amplificación de dos o más regiones cromosómicas, incluyendo la región 7p11.2; iv) GB con amplificación aislada de una región cromosómica diferente de la región 7p11.2; y, v) GB con amplificación de varias regiones cromosómicas sin alteración de la región 7p11.2, ni del gen *EGFR*, asociándose la ausencia de amplificación génica o la amplificación aislada del gen *EGFR* con una supervivencia más prolongada que la de pacientes que muestran amplificación de otros genes como *CDK4*, *PDGFRA* y *MDM4*, en ausencia de amplificación de *EGFR*.

Con relación al segundo objetivo de este trabajo centrado en el análisis del perfil de expresión de los genes amplificados con mayor frecuencia en GB y su posible impacto pronóstico:

3. En el tejido tumoral de pacientes con GB, se observan de forma prácticamente sistemática niveles de expresión anormalmente elevados de los genes *EGFR*,

CDK4, *MDM4* y *PDGFRA*, respecto a los detectadas en tejido cerebral normal, sin que dichos perfiles de expresión génica muestren un impacto significativo en la supervivencia global de los pacientes con GB.

Respecto al tercer objetivo de este trabajo, con el que perseguíamos diseñar una estrategia metodológica novedosa para el análisis detallado, mediante CMF, de la composición celular del tejido tumoral de los GB y de su microambiente inmune, que permitiese además, contribuir a la estratificación pronóstica de los pacientes:

4. El empleo de marcajes con múltiples anticuerpos fluorescentes, analizados mediante citometría de flujo multiparamétrica, permitió demostrar la presencia prácticamente sistemática de infiltrados de células inmunes en los GB, si bien los niveles y perfiles inmunes presentes en el tumor son muy variables, con predominio de células de origen mielóide sobre las células linfoides.
5. La presencia de infiltrados tumorales mixtos de células mieloides (TAM y granulocitos neutrófilos) y linfocitos T en GB se asocia con una supervivencia significativamente más corta, en ausencia de alteración (p.ej. amplificación) del gen *EGFR*.

Referencias bibliográficas

1. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:479–489.
2. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. (2014) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol* 16 Suppl 4:iv1-63.
3. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, et al. (2021) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro Oncol* 23:iii1–iii105.
4. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109:93–108.
5. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD CW (Eds) (2016) WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System Revised 4th Edition. IARC, Lyon.
6. Rutledge WC, Kong J, Gao J et al (2013) Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Glioblastoma Are Associated with Specific Genomic Alterations and Related to Transcriptional Class. *Clin Cancer Res* 19:4951–4960.
7. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. (2021) The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 23:1231–1251.
8. Burger PC, Kleihues P (1989) Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies. *Cancer* 63:2014–2023.
9. Adair JE, Johnston SK, Mrugala MM, et al (2014) Gene therapy enhances chemotherapy tolerance and efficacy in glioblastoma patients. *J Clin Invest* 124:4082–4092.
10. Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, et al. (2015) Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol* 185:1820–1833.
11. Sippl C, Urbchat S, Kim Y, Senger S, Oertel J, Ketter R (2017) Promoter methylation of RB1, P15, P16, and MGMT and their impact on the clinical course of pilocytic astrocytomas. *Oncol Lett* 15:1600–1606.
12. Shibahara I, Sonoda Y, Saito R, et al. (2013) The expression status of CD133 is associated with the pattern and timing of primary glioblastoma recurrence. *Neuro Oncol* 15:1151–1159.
13. Radke J, Koch A, Pritsch F, et al (2019) Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients. *Acta Neuropathol Commun* 7:89.
14. Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, Konishi N (2005) Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* 85:165–175.
15. Saraiva-Esperón U, Ruibal A, Herranz M (2014) The contrasting epigenetic role of RUNX3 when compared with that of MGMT and TIMP3 in glioblastoma multiforme clinical outcomes. *J Neurol Sci* 347:325–331.
16. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, et al. (2006) p14ARF Deletion and Methylation in Genetic Pathways to Glioblastomas. *Brain Pathol* 11:159–168.
17. Mellai M, Annovazzi L, Boldorini R, et al. (2020) SEL1L plays a major role in human malignant gliomas. *J Pathol Clin Res* 6:17–29.
18. Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061–1068.
19. Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG (2013) The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): Where wild things are altered. *FEBS J* 280:5350–5370.
20. Wang H, Wang X, Xu L, Zhang J, Cao H (2021) Analysis of the EGFR Amplification and CDKN2A Deletion Regulated Transcriptomic Signatures Reveals the Prognostic Significance of SPATS2L in Patients With Glioma. *Front Oncol* 11:551160.
21. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360:765–773.

22. Crespo I, Vital AL, Nieto AB, et al. (2011) Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. *J Mol Diagn* 13:634–647.
23. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, et al. (2010) New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol* 23:856–865.
24. Burford A, Little SE, Jury A, et al. (2013) Distinct Phenotypic Differences Associated with Differential Amplification of Receptor Tyrosine Kinase Genes at 4q12 in Glioblastoma. *PLoS One* 8:e71777.
25. Rao SK, Edwards J, Joshi AD, et al. (2010) A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *J Neurooncol* 96:169–179.
26. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, et al. (2000) Loss of Heterozygosity on Chromosome 10 Is More Extensive in Primary (De Novo) Than in Secondary Glioblastomas. *Lab Investig* 80:65–72.
27. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, et al. (2000) Loss of Heterozygosity on Chromosome 19 in Secondary Glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:539–543.
28. Xu H, Zong H, Ma C, Ming X, Shang M, Li K, He X, Du H, Cao L (2017) Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. *Oncol Lett* 14:512–516.
29. Alentorn A, Marie Y, Carpentier C, et al (2012) Prevalence, clinico-pathological value, and co-occurrence of PDGFRA abnormalities in diffuse gliomas. *Neuro Oncol* 14:1393–1403.
30. Zawlik I, Kita D, Vaccarella S, et al. (2009) Common polymorphisms in the MDM2 and TP53 genes and the relationship between TP53 mutations and patient outcomes in glioblastomas. *Brain Pathol* 19:188–194.
31. Miles X, Vandevoorde C, Hunter A, Bolcaen J (2021) MDM2/X inhibitors as radiosensitizers for glioblastoma targeted therapy. *Front Oncol* 11:703442.
32. Christensen BC, Smith AA, Zheng S, et al (2011) DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *J Natl Cancer Inst* 103:143–153.
33. Arita H, Narita Y, Fukushima S, et al (2013) Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol* 126:267–276.
34. Liu X-Y, Gerges N, Korshunov A, et al (2012) Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol* 124:615–625.
35. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H (2007) PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 113:295–302.
36. Reitman ZJ, Yan H (2010) Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst* 102:932–941.
37. Zhao S, Lin Y, Xu W, et al (2009) Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1 α . *Science* (80-) 10;324:261–265.
38. Dang L, White DW, Gross S, et al (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462:739–744.
39. Bady P, Sciuscio D, Diserens A-C, et al (2012) MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol* 124:547–560.
40. Chai R, Li G, Liu Y, et al (2021) Predictive value of MGMT promoter methylation on the survival of TMZ treated IDH-mutant glioblastoma. *Cancer Biol Med* 18:272–282.
41. Vital AL, Taberner MD, Crespo I, et al. (2010) Intratumoral patterns of clonal evolution in gliomas. *Neurogenetics* 11:227–239.
42. Appin CL, Brat DJ (2014) Molecular Genetics of Gliomas. *Cancer J* 20:66–72.
43. Carico C, Nuño M, Mukherjee D, et al (2012) Loss of PTEN Is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *PLoS One*

- 7:e33684.
44. Crespo I, Tão H, Nieto AB, et al (2012) Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: impact on gene expression levels. *PLoS One* 7:e46088.
 45. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155:462–477.
 46. Arjona D, Bello MJ, Alonso ME, et al. (2005) Molecular analysis of the EGFR gene in astrocytic gliomas: mRNA expression, quantitative-PCR analysis of non-homogeneous gene amplification and DNA sequence alterations. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:384–394.
 47. Fuller GN, Bigner SH (1992) Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat Res* 276:299–306.
 48. Viana-Pereira M, Lopes JM, Little S, et al. (2008) Analysis of EGFR overexpression, EGFR gene amplification and the EGFRvIII mutation in Portuguese high-grade gliomas. *Anticancer Res* 28:913–920.
 49. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA (2010) Epidermal Growth Factor Receptor in Glioma: Signal Transduction, Neuropathology, Imaging, and Radioresistance. *Neoplasia* 12:675–684.
 50. Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, et al. (1998) The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J Neurovirol* 4:148–158.
 51. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP (1992) Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4309–4313.
 52. Kastnerhuber ER, Huse JT, Berman SH, et al (2014) Quantitative assessment of intragenic receptor tyrosine kinase deletions in primary glioblastomas: Their prevalence and molecular correlates. *Acta Neuropathol* 127:747–759.
 53. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD (2000) Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 60:1383–1387.
 54. Paul I, Bhattacharya S, Chatterjee A, Ghosh MK (2013) Current Understanding on EGFR and Wnt/ β -Catenin Signaling in Glioma and Their Possible Crosstalk. *Genes and Cancer* 4:427–446.
 55. Vital AL, Taberner MD, Castrillo A, et al. (2010) Gene expression profiles of human glioblastomas are associated with both tumor cytogenetics and histopathology. *Neuro Oncol* 12:991–1003.
 56. Tso C-L, Freije WA, Day A, et al (2006) Distinct Transcription Profiles of Primary and Secondary Glioblastoma Subgroups. *Cancer Res* 66:159–167.
 57. Erdem-Eraslan L, Gravendeel LA, de Rooi J, et al (2013) Intrinsic molecular subtypes of glioma are prognostic and predict benefit from adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in combination with other prognostic factors in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC stu. *J Clin Oncol* 31:328–336.
 58. Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, et al (2003) Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 63:1602–1607.
 59. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9:157–173.
 60. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al (2010) Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98–110.
 61. Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z, et al. (2004) Gene Expression Profiling of Gliomas Strongly Predicts Survival. *Cancer Res* 64:6503–6510.

62. Lee Y, Scheck AC, Cloughesy TF, et al. (2008) Gene expression analysis of glioblastomas identifies the major molecular basis for the prognostic benefit of younger age. *BMC Med Genomics* 1:52.
63. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al (2008) An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* (80-) 321:1807–1812.
64. Han J, Jing Y, Han F, Sun P (2021) Comprehensive analysis of expression, prognosis and immune infiltration for TIMPs in glioblastoma. *BMC Neurol* 21:447.
65. Yin W, Tang G, Zhou Q, et al. (2019) Expression Profile Analysis Identifies a Novel Five-Gene Signature to Improve Prognosis Prediction of Glioblastoma. *Front Genet* 10:419.
66. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, et al (2012) Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev* 26:756–784.
67. Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko I V, Hamada J-I (2011) Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers (Basel)* 3:3242–3278.
68. Zheng Y, McFarland BC, Drygin D, et al. (2013) Targeting Protein Kinase CK2 Suppresses Prosurvival Signaling Pathways and Growth of Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19:6484–6494.
69. Cantanhede IG, de Oliveira JRM (2017) PDGF Family Expression in Glioblastoma Multiforme: Data Compilation from Ivy Glioblastoma Atlas Project Database. *Sci Rep* 7:15271.
70. Rheinbay E, Suvà ML, Gillespie SM, et al (2013) An Aberrant Transcription Factor Network Essential for Wnt Signaling and Stem Cell Maintenance in Glioblastoma. *Cell Rep* 3:1567–1579.
71. Nicholas MK, Lukas R V., Jafri NF, et al. (2006) Epidermal growth factor receptor-mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res* 12:7261–7270.
72. Huang PH, Xu AM, White FM (2009) Oncogenic EGFR Signaling Networks in Glioma. *Sci Signal* 2:re6.
73. Patil CG, Nuño M, Elramsisy A, et al (2013) High levels of phosphorylated MAP kinase are associated with poor survival among patients with glioblastoma during the temozolomide era. *Neuro Oncol* 15:104–111.
74. Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:11–22.
75. Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, et al. (2003) Oncogenic Ras and Akt Signaling Contribute to Glioblastoma Formation by Differential Recruitment of Existing mRNAs to Polysomes. *Mol Cell* 12:889–901.
76. Koul D (2008) PTEN Signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther* 7:1321–1325
77. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683–2710.
78. Seok-Ho Moon, Dae-Kwan Kim, Young Cha, Iksoo Jeon, Jihwan Song K-SP (2013) PI3K/Akt and Stat3 signaling regulated by PTEN control of the cancer stem cell population, proliferation and senescence in a glioblastoma cell line. *Int J Oncol* 42:921–928.
79. Knudsen ES, Wang JYJ (2010) Targeting the RB-pathway in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 16:1094–1099.
80. Inoue K, Fry EA (2018) Aberrant Expression of p14ARF in Human Cancers: A New Biomarker? *Tumor Microenviron* 1:37–44.
81. Shangary S, Wang S (2009) Small-Molecule Inhibitors of the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction to Reactivate p53 Function: A Novel Approach for Cancer Therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:223–241.
82. Dasari VR, Kaur K, Velpula KK, et al. (2010) Upregulation of PTEN in Glioma Cells by Cord Blood Mesenchymal Stem Cells Inhibits Migration via Downregulation of the PI3K/Akt Pathway. *PLoS One* 5:e10350.
83. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, et al. (2010) Exciting new advances in neuro-

- oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60:166–193.
84. Zhang Y, Dube C, Gibert M, et al (2018) The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 10:297.
 85. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, et al (2008) Stem Cell–Related “Self-Renewal” Signature and High Epidermal Growth Factor Receptor Expression Associated With Resistance to Concomitant Chemoradiotherapy in Glioblastoma. *J Clin Oncol* 26:3015–3024.
 86. Benito R, Gil-Benso R, Quilis V, et al. (2010) Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: Relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathology* 30:392–400.
 87. Okada H, Kalinski P, Ueda R, et al (2011) Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with {alpha}-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in . *J Clin Oncol* 29:330–336.
 88. Pelloso CE, Ballman K V., Furth AF, et al (2007) Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Status Defines Clinically Distinct Subtypes of Glioblastoma. *J Clin Oncol* 25:2288–2294
 89. Montano N, Cenci T, Martini M, et al. (2011) Expression of EGFRvIII in glioblastoma: Prognostic significance revisited. *Neoplasia* 13:1113–1121.
 90. van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, et al (2009) Randomized Phase II Trial of Erlotinib Versus Temozolomide or Carmustine in Recurrent Glioblastoma: EORTC Brain Tumor Group Study 26034. *J Clin Oncol* 27:1268–1274.
 91. Keller S, Schmidt M (2017) EGFR and EGFRvIII Promote Angiogenesis and Cell Invasion in Glioblastoma: Combination Therapies for an Effective Treatment. *Int J Mol Sci* 18:1295.
 92. Mosrati MA, Malmström A, Lysiak M, et al (2015) TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget* 6:16663–16673.
 93. Huang Y, Hoffman C, Rajappa P, et al (2014) Oligodendrocyte Progenitor Cells Promote Neovascularization in Glioma by Disrupting the Blood–Brain Barrier. *Cancer Res* 74:1011–1021.
 94. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, et al. (2010) Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13–25.
 95. Johnson TS, Munn DH, Maria BL (2012) Modulation of tumor tolerance in primary central nervous system malignancies. *Clin Dev Immunol* 2012:937253.
 96. Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO (2017) The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol* 18:123–131.
 97. Derecki NC, Katzmarzki N, Kipnis J, Meyer-Luehmann M (2014) Microglia as a critical player in both developmental and late-life CNS pathologies. *Acta Neuropathol* 128:333–345.
 98. Prinz M, Tay TL, Wolf Y, Jung S (2014) Microglia: unique and common features with other tissue macrophages. *Acta Neuropathol* 128:319–331.
 99. Parney IF, Waldron JS, Parsa AT, et al. (2009) Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages: Laboratory investigation. *J Neurosurg* 110:572–582.
 100. Hao N-B, Lü M-H, Fan Y-H, et al. (2012) Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clin Dev Immunol* 2012:1–11.
 101. Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, et al. (2017) Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* (80-) 356:513–519.
 102. Shiao SL, Ganesan AP, Rugo HS, Coussens LM (2011) Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy. *Genes Dev* 25:2559–2572.
 103. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11:519–531.
 104. Biswas SK, Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11:889–896.

105. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496:445–455.
106. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR (2013) Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14:986–995.
107. Sharda DR, Yu S, Ray M, et al. (2011) Regulation of Macrophage Arginase Expression and Tumor Growth by the Ron Receptor Tyrosine Kinase. *J Immunol* 187:2181–2192.
108. Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM (2008) Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 371:771–783.
109. Muraille E, Leo O, Moser M (2014) Th1/Th2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-Driven escape mechanism? *Front Immunol* 5:603.
110. Hao NB, Lü MH, Fan YH, et al. (2012) Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* 2012:1–11.
111. Sun W, Depping R, Jelkmann W (2014) Interleukin-1 β promotes hypoxia-induced apoptosis of glioblastoma cells by inhibiting hypoxia-inducible factor-1 mediated adrenomedullin production. *Cell Death Dis* 5:e1020–e1020.
112. Domingues P, González-Tablas M, Otero Á, et al (2016) Tumor infiltrating immune cells in gliomas and meningiomas. *Brain Behav Immun* 53:1–15.
113. Whiteside TL (2008) The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27:5904–5912.
114. Khan S, Mittal S, McGee K, et al. (2020) Role of Neutrophils and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Glioma Progression and Treatment Resistance. *Int J Mol Sci* 21:1954.
115. Hussain SF, Yang D, Suki D, Al. E (2006) The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses¹. *Neuro Oncol* 8:261–279.
116. Okada M, Saio M, Kito Y, et al. (2009) Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1. *Int J Oncol* 34:1621–1627.
117. Lapa C, Linsenmann T, Lückerath K, et al. (2015) Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma Multiforme—A Suitable Target for Somatostatin Receptor-Based Imaging and Therapy? *PLoS One* 10:e0122269.
118. Orrego E, Castaneda CA, Castillo M, et al (2018) Distribution of tumor-infiltrating immune cells in glioblastoma. *CNS Oncol* 7:CNS21.
119. Yang I, Han SJ, Sughrue ME, Tihan T, Parsa AT (2011) Immune cell infiltrate differences in pilocytic astrocytoma and glioblastoma: evidence of distinct immunological microenvironments that reflect tumor biology. *J Neurosurg* 115:505–511.
120. Prosniak M, Harshyne LA, Andrews DW, et al. (2013) Glioma Grade Is Associated with the Accumulation and Activity of Cells Bearing M2 Monocyte Markers. *Clin Cancer Res* 19:3776–3786.
121. Friebe E, Kapolou K, Unger S, et al (2020) Single-Cell Mapping of Human Brain Cancer Reveals Tumor-Specific Instruction of Tissue-Invading Leukocytes. *Cell* 181:1626-1642.e20.
122. Jayasingam SD, Citartan M, Thang TH, et al. (2020) Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol* 9:1512.
123. Xuan W, Qu Q, Zheng B, Xiong S, Fan G-H (2015) The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J Leukoc Biol* 97:61–69.
124. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M (2008) Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* 216:15–24.
125. Gielen PR, Schulte BM, Kers-Rebel ED, et al. (2016) Elevated levels of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in patients with glioblastoma highly express S100A8/9 and arginase and suppress T cell function. *Neuro Oncol* 18:1253–1264.

126. Quail DF, Joyce JA (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19:1423–1437.
127. Dubinski D, Wölfer J, Hasselblatt M, et al. (2016) CD4 + T effector memory cell dysfunction is associated with the accumulation of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in glioblastoma patients. *Neuro Oncol* 18:807–818.
128. Liang JJ, Piao Y, Holmes L, et al. (2014) Neutrophils Promote the Malignant Glioma Phenotype through S100A4. *Clin Cancer Res* 20:187–198.
129. Pinzon-Charry A, Ho CSK, Laherty R, et al (2005) A Population of HLA-DR+ Immature Cells Accumulates in the Blood Dendritic Cell Compartment of Patients with Different Types of Cancer. *Neoplasia* 7:1112–1122.
130. El Andaloussi A, Lesniak MS (2007) CD4+ CD25+ FoxP3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. *J Neurooncol* 83:145–152.
131. Waziri A, Killory B, Ogden AT, et al. (2008) Preferential in situ CD4+CD56+ T cell activation and expansion within human glioblastoma. *J Immunol* 180:7673–7680.
132. Kmiecik J, Poli A, Brons NHCC, et al. (2013) Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J Neuroimmunol* 264:71–83.
133. Heimberger AB, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C, et al. (2008) Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. *Clin Cancer Res* 14:5166–5172.
134. Jacobs JFM, Idema AJ, Bol KF, et al. (2009) Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors. *Neuro Oncol* 11:394–402.
135. Domingues PH, Teodósio C, Ortiz J, et al (2012) Immunophenotypic Identification and Characterization of Tumor Cells and Infiltrating Cell Populations in Meningiomas. *Am J Pathol* 181:1749–1761.
136. Umemura N, Saio M, Suwa T, et al (2008) Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J Leukoc Biol* 83:1136–1144.
137. Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E (2013) Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects. *Immunol Cell Biol* 91:493–502.
138. Kohanbash G, Okada H (2012) Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in gliomas and glioma-development. *Immunol Invest* 41:658–679.
139. Ghouzlani A, Kandoussi S, Tall M, et al. (2021) Immune Checkpoint Inhibitors in Human Glioma Microenvironment. *Front Immunol* 12:679425.
140. Gousias K, von Ruecker A, Voulgari P, Simon M (2013) Phenotypical analysis, relation to malignancy and prognostic relevance of ICOS+T regulatory and dendritic cells in patients with gliomas. *J Neuroimmunol* 264:84–90.
141. Lohr J, Ratliff T, Huppertz A, et al (2011) Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived TGF-beta. *Clin Cancer Res* 17:4296–4308.
142. Kim YH, Jung TY, Jung S, et al. (2012) Tumour-infiltrating T-cell subpopulations in glioblastomas. *Br J Neurosurg* 26:21–27.
143. El Andaloussi A, Lesniak MS (2006) An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 8:234–243.
144. Hussain SF, Yang D, Suki D, et al. (2006) Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients. *J Transl Med* 4:15.
145. Hao S, Andersen M, Yu H (2013) Detection of immune suppressive neutrophils in peripheral blood samples of cancer patients. *Am J Blood Res* 3:239–245.
146. Massara M, Persico P, Bonavita O, et al. (2017) Neutrophils in Gliomas. *Front Immunol*

- 8:1349.
147. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD (2006) Cancer Immun-surveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. *Adv Immunol* 9:1–50.
 148. Zisakis A, Piperi C, Themistocleous MS, Korkolopoulou P, Boviatsis EI, Sakas DE, Patsouris E, Lea RW, Kalofoutis A (2007) Comparative analysis of peripheral and localised cytokine secretion in glioblastoma patients. *Cytokine* 39:99–105.
 149. Candolfi M, Curtin JF, Yagiz K, et al (2011) B cells are critical to T-cell-mediated antitumor immunity induced by a combined immune-stimulatory/conditionally cytotoxic therapy for glioblastoma. *Neoplasia* 13:947–960.
 150. Kmiecik J, Zimmer J, Chekenya M (2014) Natural killer cells in intracranial neoplasms: presence and therapeutic efficacy against brain tumours. *J Neurooncol* 116:1–9.
 151. Castriconi R, Daga A, Dondero A, et al (2009) NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties. *J Immunol* 182:3530–3539.
 152. Alizadeh D, Zhang L, Brown CE, Farrukh O, Jensen MC, Badie B (2010) Induction of Anti-Glioma Natural Killer Cell Response following Multiple Low-Dose Intracerebral CpG Therapy. *Clin Cancer Res* 16:3399–3408.
 153. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12:298–306.
 154. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, et al. (2011) Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 29:1949–1955.
 155. Szulzewsky F, Pelz A, Feng X, et al (2015) Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. *PLoS One* 10:1–27.
 156. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, et al (2013) CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med* 19:1264–1272.
 157. Quail DF, Joyce JA (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19:1423–1437.
 158. van Dalen FJ, van Stevendaal MHME, Fennemann FL, et al. (2018) Molecular Repolarisation of Tumour-Associated Macrophages. *Molecules* 24:9.
 159. Wurdinger T, Deumelandt K, van der Vliet HJ, et al. (2014) Mechanisms of intimate and long-distance cross-talk between glioma and myeloid cells: How to break a vicious cycle. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1846:560–575.
 160. Alban TJ, Alvarado AG, Sorensen MD, et al (2018) Global immune fingerprinting in glioblastoma patient peripheral blood reveals immune-suppression signatures associated with prognosis. *JCI insight* 3:e122264.
 161. Peereboom DM, Alban TJ, Grabowski MM, et al (2019) Metronomic capecitabine as an immune modulator in glioblastoma patients reduces myeloid-derived suppressor cells. *JCI insight* 4:e130748.
 162. Wang P-F, Song H-W, Cai H-Q, et al. (2017) Preoperative inflammation markers and IDH mutation status predict glioblastoma patient survival. *Oncotarget* 8:50117–50123.
 163. Amankulor NM, Kim Y, Arora S, et al (2017) Mutant IDH1 regulates the tumor-associated immune system in gliomas. *Genes Dev* 31:774–786.
 164. Dunn GP, Dunn IF, Curry WT, et al. (2007) Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. *Cancer Immun* 7:12.
 165. Han S, Zhang C, Li Q, et al. (2014) Tumour-infiltrating CD4+ and CD8+ lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer* 110:2560–2568.
 166. Hoepner S, Loh JM, Riccadonna C, et al. (2013) Synergy between CD8 T cells and Th1 or Th2 polarised CD4 T cells for adoptive immunotherapy of brain tumours. *PLoS One* 8:e63933.
 167. Brown NF, Carter TJ, Ottaviani D, Mulholland P (2018) Harnessing the immune system in glioblastoma. *Br J Cancer* 119:1171–1181.

168. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131:803–820.
169. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, et al. (2019) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol* 21:v1–v100.
170. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, et al. (2013) Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 110:4009–4014.
171. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, et al. (2011) The brain tumor microenvironment. *Glia* 59:1169–1180.
172. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97–109.
173. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, et al (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463:899–905.
174. Chen Z, Hambardzumyan D (2018) Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front Immunol* 9:1004.
175. Gieryng A, Pszczolkowska D, Walentynowicz KA, et al. (2017) Immune microenvironment of gliomas. *Lab Invest* 97:498–518.
176. Han S, Ma E, Wang X, et al. (2016) Rescuing defective tumor-infiltrating T-cell proliferation in glioblastoma patients. *Oncol Lett* 12:2924–2929.
177. KJ Z (1979) Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization, Geneva.
178. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al (2010) Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98–110.
179. Lin N, Yan W, Gao K, et al. (2014) Prevalence and Clinicopathologic Characteristics of the Molecular Subtypes in Malignant Glioma: A Multi-Institutional Analysis of 941 Cases. *PLoS One* 9:e94871.
180. Crisman TJ, Zelaya I, Laks DR, et al. (2016) Identification of an Efficient Gene Expression Panel for Glioblastoma Classification. *PLoS One* 11:e0164649.
181. Park J, Shim J-K, Yoon S-J, et al. (2019) Transcriptome profiling-based identification of prognostic subtypes and multi-omics signatures of glioblastoma. *Sci Rep* 9:10555.
182. Park AK, Kim P, Ballester LY, et al. (2019) Subtype-specific signaling pathways and genomic aberrations associated with prognosis of glioblastoma. *Neuro Oncol* 21:59–70
183. Zhang P, Xia Q, Liu L, et al. (2020) Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Front Mol Biosci* 7:562798.
184. Kawaguchi A, Yajima N, Tsuchiya N, et al. (2013) Gene expression signature-based prognostic risk score in patients with glioblastoma. *Cancer Sci* 104:1205–1210.
185. Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, et al (2012) Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3041–3046.
186. Jeuken J, Sijben A, Alenda C, et al. (2009) Robust Detection of EGFR Copy Number Changes and EGFR Variant III: Technical Aspects and Relevance for Glioma Diagnostics. *Brain Pathol* 19:661–671.
187. Srividya MR, Thota B, Arivazhagan A, et al. (2010) Age-dependent prognostic effects of EGFR/p53 alterations in glioblastoma: study on a prospective cohort of 140 uniformly treated adult patients. *J Clin Pathol* 63:687–691.
188. Hobbs J, Nikiforova MN, Fardo DW, et al. (2012) Paradoxical Relationship Between the Degree of EGFR Amplification and Outcome in Glioblastomas. *Am J Surg Pathol* 36:1186–1193.
189. Furgason JM, Koncar RF, Michelhaugh SK, et al. (2015) Whole genome sequence analysis

- links chromothripsis to EGFR, MDM2, MDM4, and CDK4 amplification in glioblastoma. *Oncoscience* 2:618–628.
190. Chakravarty D, Pedraza AM, Cotari J, et al. (2017) EGFR and PDGFRA co-expression and heterodimerization in glioblastoma tumor sphere lines. *Sci Rep* 7:1–10.
 191. Turner KM, Sun Y, Ji P, et al (2015) Genomically amplified Akt3 activates DNA repair pathway and promotes glioma progression. *Proc Natl Acad Sci* 112:3421–3426.
 192. Eley GD, Reiter JL, Pandita A, et al. (2002) A chromosomal region 7p11.2 transcript map: Its development and application to the study of EGFR amplicons in glioblastoma. *Neuro Oncol* 4:86–94.
 193. Zeng M, van der Donk WA, Chen J (2014) Lanthionine synthetase C-like protein 2 (LanCL2) is a novel regulator of Akt. *Mol Biol Cell* 25:3954–3961.
 194. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, et al (2009) High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol Cancer Res* 7:665–677.
 195. Brookes S, Gagrlica S, Sanij E, et al. (2015) Evidence for a CDK4-dependent checkpoint in a conditional model of cellular senescence. *Cell Cycle* 14:1164–1173.
 196. Pei D, Zhang Y, Zheng J (2012) Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and MdmX. *Oncotarget* 3:228–235.
 197. Katso RM, Pardo OE, Palamidessi A, et al (2006) Phosphoinositide 3-Kinase C2 β Regulates Cytoskeletal Organization and Cell Migration via Rac-dependent Mechanisms. *Mol Biol Cell* 17:3729–3744.
 198. Yan W, Zhang W, You G, et al (2012) Molecular classification of gliomas based on whole genome gene expression: a systematic report of 225 samples from the Chinese Glioma Cooperative Group. *Neuro Oncol* 14:1432–1440.
 199. Le Mercier M, Hastir D, Moles Lopez X, et al. (2012) A Simplified Approach for the Molecular Classification of Glioblastomas. *PLoS One* 7:e45475.
 200. González-Tablas M, Crespo I, Vital AL, et al (2018) Prognostic stratification of adult primary glioblastoma multiforme patients based on their tumor gene amplification profiles. *Oncotarget* 9:28083–28102.
 201. Felsberg J, Hentschel B, Kaulich K, et al (2017) Epidermal Growth Factor Receptor Variant III (EGFRvIII) Positivity in EGFR-Amplified Glioblastomas: Prognostic Role and Comparison between Primary and Recurrent Tumors. *Clin Cancer Res* 23:6846–6855.
 202. Van Den Bent MJ, Gao Y, Kerkhof M, et al (2015) Changes in the EGFR amplification and EGFRvIII expression between paired primary and recurrent glioblastomas. *Neuro Oncol* 17:935–941.
 203. Lassman AB, Roberts-Rapp L, Sokolova I, et al (2019) Comparison of Biomarker Assays for EGFR : Implications for Precision Medicine in Patients with Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 25:3259–3265.
 204. Wang S, Liu F, Wang Y, et al. (2019) Integrated analysis of 34 microarray datasets reveals CBX3 as a diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma. *J Transl Med* 17:179.
 205. Maire CL, Ligon KL (2014) Molecular pathologic diagnosis of epidermal growth factor receptor. *Neuro Oncol* 16:viii1–viii6.
 206. Chakraborty S, Li L, Puliappadamba VT, et al (2014) Constitutive and ligand-induced EGFR signalling triggers distinct and mutually exclusive downstream signalling networks. *Nat Commun* 5:5811.
 207. Li L, Puliappadamba VT, Chakraborty S, et al (2015) EGFR wild type antagonizes EGFRvIII-mediated activation of Met in glioblastoma. *Oncogene* 34:129–134.
 208. Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, et al. (2001) Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res* 61:1122–1128.
 209. Shinjima N, Tada K, Shiraishi S, et al (2003) Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor in Patients with Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res* 63:6962–6970.

210. Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, et al. (2006) Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer* 106:2218–2223.
211. Costa BM, Viana-Pereira M, Fernandes R, et al (2011) Impact of EGFR Genetic Variants on Glioma Risk and Patient Outcome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20:2610–2617.
212. Li J, Liang R, Song C, Xiang Y, Liu Y (2018) Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in glioma patients. *Onco Targets Ther* Volume 11:731–742.
213. Bienkowski M, Piaskowski S, Stoczyńska-Fidelus E, et al (2013) Screening for EGFR Amplifications with a Novel Method and Their Significance for the Outcome of Glioblastoma Patients. *PLoS One* 8:e65444.
214. Balik V, Mirossay P, Bohus P, et al. (2009) Flow cytometry analysis of neural differentiation markers expression in human glioblastomas may predict their response to chemotherapy. *Cell Mol Neurobiol* 29:845–858.
215. Brahmachari S (2006) Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. *J Neurosci* 26:4930–4939.
216. Glumac PM, LeBeau AM (2018) The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med* 7:18.
217. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396–401.
218. Song W-S, Yang Y-P, Huang C-S, et al (2016) Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. *J Chinese Med Assoc* 79:538–545.
219. Zhang Y, Li B, Zhang X, et al (2017) CD24 is a genetic modifier for risk and progression of prostate cancer. *Mol Carcinog* 56:641–650.
220. González-Tablas M, Arandia D, Jara-Acevedo M, et al (2020) Heterogeneous EGFR, CDK4, MDM4, and PDGFRA Gene Expression Profiles in Primary GBM: No Association with Patient Survival. *Cancers (Basel)* 12:231.
221. Kumar R, de Mooij T, Peterson TE, et al. (2017) Modulating glioma-mediated myeloid-derived suppressor cell development with sulforaphane. *PLoS One* 12:e0179012.
222. Quail DF, Joyce JA (2017) The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* 31:326–341.
223. Gabrusiewicz K, Rodriguez B, Wei J, et al (2016) Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI Insight* 1:e85841.
224. Han F, Hu R, Yang H, et al. (2016) PTEN gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 9:3485–3492.
225. Jack AS., JK. & L (2015) Immune Cell Infiltrates in the Central Nervous System Tumors. *Austin Neurosurg Open Access* 2(1):1024.
226. Zhang B, Shen R, Cheng S, Feng L (2019) Immune microenvironments differ in immune characteristics and outcome of glioblastoma multiforme. *Cancer Med* 8:2897–2907.
227. Engler JR, Robinson AE, Smirnov I, et al. (2012) Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas. *PLoS One* 7:e43339.
228. Raychaudhuri B, Rayman P, Huang P, et al. (2015) Myeloid derived suppressor cell infiltration of murine and human gliomas is associated with reduction of tumor infiltrating lymphocytes. *J Neurooncol* 122:293–301.
229. Guadagno E, Presta I, Maisano D, et al (2018) Role of Macrophages in Brain Tumor Growth and Progression. *Int J Mol Sci* 19:1005.
230. Liang J, Piao Y, Holmes L, et al. (2014) Neutrophils Promote the Malignant Glioma Phenotype through S100A4. *Clin Cancer Res* 20:187–198.
231. Farmer J-P, Antel JP, Freedman M, et al. (1989) Characterization of lymphoid cells isolated from human gliomas. *J Neurosurg* 71:528–533.
232. Liang J, Lv X, Lu C, et al. (2020) Prognostic factors of patients with Gliomas – an analysis on 335 patients with Glioblastoma and other forms of Gliomas. *BMC Cancer* 20:35.
233. Daigle K, Fortin D, Mathieu D, et al. (2013) Effects of surgical resection on the evolution

- of quality of life in newly diagnosed patients with glioblastoma: a report on 19 patients surviving to follow-up. *Curr Med Res Opin* 29:1307–1313.
234. Wang J, Hu G, Quan X (2019) Analysis of the factors affecting the prognosis of glioma patients. *Open Med* 14:331–335.
235. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al (2001) PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* 93:1246–1256.
236. An Z, Knobbe-Thomsen CB, Wan X, et al. (2018) EGFR Cooperates with EGFRvIII to Recruit Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Res* 78:6785–6794.
237. Hao Z, Guo D (2019) EGFR mutation: novel prognostic factor associated with immune infiltration in lower-grade glioma; an exploratory study. *BMC Cancer* 19:1184.

Ilustración de cubierta
Carolina Pontes Geraz Caldas
“El curso”
Salamanca, septiembre 2022