

# IMPACTO CLÍNICO DE UN PATRÓN DE CADENAS LARGAS DE ARN NO CODIFICANTES EN EL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

SERGIO ANDRÉS TORRES BAYONA

DIRECTORES

ANDER MATHEU FERNÁNDEZ

DAVID OTAEGUI BICHOT

TESIS DOCTORAL 2017



**biodonostia**

osun ikerketa institutua  
instituto de investigación sanitaria



NAZIOARTEKO  
BIKANTASUN  
CAMPUSA  
CAMPUS DE  
EXCELENCIA  
INTERNACIONAL



# IMPACTO CLÍNICO DE UN PATRÓN DE CADENAS LARGAS DE ARN NO CODIFICANTES EN EL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

SERGIO ANDRÉS TORRES BAYONA

DIRECTORES

ANDER MATHEU FERNÁNDEZ

DAVID OTAEGUI BICHOT

TESIS DOCTORAL 2017



*A todos los que hicieron  
realidad este sueño*

***"Tarde o temprano la disciplina vencerá a la inteligencia"***

Proverbio Japonés

***"Quien quiere hacer algo encuentra un medio, quien no quiere hacerlo encuentra una excusa"***

Proverbio Árabe



# ***AGRADECIMIENTOS***



Quiero dedicar estas palabras para agradecer a todos los que con su ayuda me han permitido alcanzar mis objetivos, tanto en el desarrollo de esta tesis, así como en mi carrera y en mi residencia. Ha sido un largo camino y sin ustedes, nada de esto habría sido posible, nunca me cansaré de agradecerles.

Para empezar, agradecer a mi director de tesis, el Dr. Ander Matheu, por permitirme trabajar contigo, por confiar en mí, tenerme paciencia, por motivarme en todo momento, por poner en mi camino a las personas adecuadas para que me formaran en la labor investigadora del laboratorio y por sumergirme en este mundo, de los incomprendidos, long non coding RNAs. Solo espero no haberte defraudado.

Al Dr. Mariano Arrazola, mi tutor, porque me llevó con Ander desde el primer mes de residencia, por sus consejos no solo de Neurocirugía, sino también de algo muy importante, la vida (incluido el deporte).

A todas las personas de Biodonostia, sin ustedes no hubiese sido posible llevar a cabo este trabajo. Hace ya 4 años que aterricé allí, y casi 3 dedicado a la tesis. Gracias Estefanía por enseñarme durante varios meses todas las técnicas, ya que fueron la base de mi investigación. Gracias Paula, porque has dedicado muchas horas a continuar enseñándome, a orientarme, y a acompañarme en los experimentos, fuiste un pilar fundamental en el proceso. Gracias Idoia por tus consejos, siempre fue un placer hablar contigo, aún recuerdo con gracia nuestra primera estereotaxia. Gracias Jaione, tu ayuda en la recta final fue como un bálsamo, eres una máquina, mantén esa alegría y entusiasmo. Gracias también a los que de una forma u otra participaron en algún momento, gracias Leire por tu ayuda en los análisis, gracias a Cristina por el análisis estadístico, gracias David, y a todo el personal del animalario.

A mi familia, a mi mamá porque desde siempre me inculcó el estudio y el trabajo como valores fundamentales. A Yeiris, mi compañera, que casi siempre me esperaba en casa con una sonrisa para reponerme del día, y a mis hermanos por su apoyo.

A mi querido jefe, mi maestro, el Dr. Enrique Úrculo, gracias por enseñarme toda la neurocirugía de la A a la Z. Fueron cientos de horas de cirugía juntos, sus enseñanzas no serán en vano, todos sus trucos me harán el mejor

neurocirujano de Colombia.

A todo el servicio de Neurocirugía del Hospital Donostia. A la Dra. Alicia Bollar, me quedaré corto de palabras, aunque no le guste, una vez más, mil gracias por su apoyo incondicional. A Nico, llevo muy presente todos tus consejos, gracias por ayudarme con la redacción. Al resto del equipazo, Mikel, Jose, Patri, Joaquin y Alex, gracias por su comprensión porque he podido compaginar la residencia y el doctorado. Al personal de quirófano, Maite, Anita, la Amorosi e itxi, gracias por sus consejos, me han hecho muy amenas las cirugías. Al personal de enfermería, gracias Francis por los postres que me endulzaron los días amargos, gracias Arantza por todas tus buenas historias y tus consejos, gracias Izaskun y Bego por consentirme tanto (Bego ya correremos algún día una carrera), gracias Josu x2, gracias Angels porque sin ti esos 3 años de consulta hubieran sido eternos, y gracias al resto, hubiese querido tener más tiempo para compartir, gracias por la compañía y los buenos momentos, en especial por la comprensión en las guardias y en los salientes, que muchas veces se hacen duros y no tenemos la mejor cara. Andoni, ¡Que grande eres!, ya quiero yo algún día llegar a trabajar todos los días con una sonrisa, gracias por los días que me alegraste con tu buen humor.

Al Comité de Neurooncología del Hospital Donostia, a cargo de la excelente atención que reciben los pacientes.

A Iratxe Urreta del Hospital Donostia por el análisis estadístico.

Espero que la amistad que hemos creado se mantenga en el futuro, aunque hubo momentos difíciles, fueron mucho más los buenos, espero que mi recuerdo sea bueno.

***Mil gracias, Ekerrik asko, perfektua atera da***

# ***ÍNDICE***



AGRADECIMIENTOS.....	17
ÍNDICE.....	21
ABREVIATURAS.....	25
RESUMEN .....	29
INTRODUCCIÓN.....	33
GENERALIDADES DEL GBM.....	35
Epidemiología.....	35
Etiología y Clasificación.....	35
Diagnóstico .....	36
Tratamiento.....	37
Recidiva o progresión de la enfermedad.....	38
Factores pronósticos.....	38
BASES BIOLÓGICAS Y CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GLIOBLASTOMA (GBM).....	39
Vías de señalización con implicaciones terapéuticas en el GBM.....	42
HETEROGENEIDAD CELULAR DEL GBM.....	44
Reguladores de la heterogeneidad celular.....	45
Factores de transcripción SOX.....	45
Transductor de señales y activador de la transcripción (STAT).....	
45 Gen de la leucemia promielocítica (PML).....	46
REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL GLIOBLASTOMA.....	47
LONG NON CODING RNA (LncRNA) .....	47
Organización genómica y funciones de los LncRNAs.....	47
Papel de los LncRNAs en la oncogénesis.....	48
Papel de los LncRNAs en la gliomagénesis.....	49
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
Diseño.....	61
Criterios de inclusión.....	61
Pacientes incluidos.....	61
Pacientes excluidos.....	61
Recogida de datos.....	61
Análisis de la edad.....	61
Análisis del volumen de extirpación quirúrgica.....	62
Análisis de la situación funcional pre-quirúrgica de los pacientes.....	62
Base de datos de pacientes.....	63
Caracterización de la expresión de los LncRNAs.....	64
Muestras humanas de pacientes con Glioblastoma.....	64

Líneas celulares y cultivos.....	64
Extracción de ARN total.....	64
Transcripción reversa (RT).....	65
PCR cuantitativa (Q-RT-PCR).....	65
Modulación de la expresión génica mediante transfección.....	66
Ensayos funcionales .....	67
Ensayo de proliferación .....	67
Ensayo de formación de esferas y capacidad de auto-renovación de las células madre .....	67
Análisis de la expresión de proteínas .....	68
Inmunofluorescencia.....	68
Análisis estadístico.....	68
consideraciones éticas.....	69
RESULTADOS.....	71
Los niveles de expresión de los LncRNAs 1, 5 y 10 disminuyen con el aumento en el estadio del gliomas .....	73
Los LncRNAs 1,5 y 10 se sobre-expresaron en muestras humanas de glioma en comparación con el tejido cerebral peritumoral.....	74
Correlación de niveles de los LncRNAs 1, 5 y 10 con variables clínicas prequirúrgicas.....	76
Correlación de niveles de los LncRNAs 1, 5 y 10 con variables clínicas prequirúrgicas.....	77
Correlación de niveles de los LncRNAs 1, 5 y 10 con variables moleculares.....	79
Correlación de niveles de los LncRNAs 1, 5 y 10 con la supervivencia.....	80
El silenciamiento de los LncRNA 1 y 10 incrementa la capacidad proliferativa de las células de glioma.....	82
DISCUSIÓN.....	87
CONCLUSIONES.....	99
BIBLIOGRAFÍA.....	103

# ***ABREVIATURAS***



ADN: Ácido desoxirribonucleico  
 ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario  
 ARN: Ácido ribonucleico  
 ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
 ASOs: antisense oligonucleotides (oligonucleótidos antisentido)  
 CMT: Célula Madre Tumoral (Cancer Stem Cell o CSC)  
 CSC: Cancer Stem Cell (Célula madre del cáncer o célula madre tumoral)  
 DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco  
 EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)  
 GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)  
 GBM: Glioblastoma Multiforme  
 GNS: Glioma Neural Stem (Célula madre neural)  
 GSC: Glioma Stem Cell (Célula madre de glioma)  
 GST: gen supresor de tumor  
 HUD: Hospital Universitario Donostia  
 IDH: Isocitrato dehidrogenasa.  
 IHQ: inmunohistoquímica  
 IK: índice de Karnofsky.  
 LncRNA: long non coding RNA (ARN de cadena larga)  
 MGMT: Metil Guanina Metil Transferasa  
 mTOR: Mammalian Target of Rapamycin (diana de rapamicina en células de mamífero)  
 NSC: Neural Stem Cell (Célula madre neural)  
 OMS: Organización Mundial de la Salud  
 PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la ADN polimerasa)  
 PDGF: Platelet-Derived Growth Factor (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)  
 PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor (Receptor de factores de crecimiento derivados de plaquetas)  
 PML: Promyelocytic Leukemia gen (gen de la Leucemia Promielocítica)  
 pRB: proteína del retinoblastoma  
 Q-RT-PCR: Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (Reacción en cadena de la ADN polimerasa cuantitativa a tiempo real)  
 RCF: Fuerza Centrífuga Relativa  
 RM: Resonancia magnética

RNAP: ARN polimerasa

RPM: Revoluciones Por Minuto

RTK: Receptor tirosina quinasa

SOX: sex-determining region Y (SRY)-box

TAC: tomografía axial computarizada

TCGA: The Cancer Genome Atlas (Atlas del Genoma del Cáncer)

TK: Tirosina quinasa

TMZ: Temozolomida

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)

# ***RESUMEN***



Los gliomas son el tumor primario cerebral más común. Se subdividen en 4 grupos según su malignidad. Dentro de estos, el GBM es el más frecuente, el más maligno y se destaca por su agresividad y resistencia al tratamiento. La mediana de supervivencia es de 14 meses del diagnóstico y menos de un 5% sobrevive 5 años. La mediana de supervivencia es de 14 meses del diagnóstico y menos de un 5% sobrevive 5 años. El avance en las técnicas de investigación sobre el genoma, transcriptoma y proteoma del GBM, ofrecen la oportunidad de comprender el proceso de la glioma-génesis como condición necesaria para diseñar estrategias terapéuticas racionales. En este proceso onco-genético están implicados un conjunto de anomalías genéticas relacionadas con la diferenciación, el control de la proliferación, del crecimiento, de la muerte y del ciclo celular.

La incorporación de métodos complementarios de diagnóstico, el refinamiento de la técnica quirúrgica, el cuidado postoperatorio, han conseguido acortar el tiempo entre el primer síntoma y el diagnóstico y disminuir la morbi-mortalidad peri-operatoria mejorando la calidad de vida de los enfermos. Sin embargo, el pronóstico de los pacientes no ha variado. El GBM es resistente al tratamiento en virtud de sus características biológicas que pueden ser comprendidas desde el punto de vista tisular, celular y molecular. Sin embargo, el mecanismo molecular exacto del GBM permanece aún desconocido. Los ARN no codificantes de cadena larga (LncRNAs, del inglés long non coding RNA) han surgido recientemente como reguladores en procesos fisiológicos y patológicos. Distintos estudios, indican que la expresión aberrante de algunos LncRNAs puede jugar un papel en la patogénesis del GBM y que podrían estar asociados con su pronóstico.

En este trabajo, caracterizamos la expresión de un patrón de LncRNAs, previamente descrito como supresor tumoral en cáncer colorectal. Se ha analizado su expresión en muestras de glioma de bajo y alto grado observando que su expresión era elevada en muestras de glioma de bajo grado y se reducía en los de alto grado, siendo los menores en la cohorte de GBM. Además, se estratificaron los GBMs en base a la expresión de los LncRNAs en altos y bajos, presentando estos últimos menor supervivencia de los pacientes, aunque no se encontró correlación estadísticamente significativa. A nivel fisiológico, los LncRNAs correlacionaron con la localización frontal, temporal y en zona elocuente, mientras que a nivel molecular se identificó una correlación inversa con los genes SOX1, SOX2 y

SOX9, genes cuyos niveles elevados se han correlacionado anteriormente con menor supervivencia y peor pronóstico. Además, mediante ensayos funcionales hemos revelado el importante papel que desarrollan estos LncRNAs en relevantes procesos fisiopatológicos como la proliferación celular y la auto-renovación lo que confirma este patrón de LncRNAs como posibles dianas terapéuticas en este tipo de cáncer.

Nuestro trabajo ha demostrado que algunos LncRNAs se expresan diferencialmente en el GBM, cuando se compara con el tejido cerebral normal y con tejido de glioma de bajo grado, y que, la reducción de su expresión se asocia a la progresión y malignización de los gliomas. En general, estos resultados subrayan el impacto que estos LncRNAs podrían tener como marcador diagnóstico en el GBM.

# ***INTRODUCCIÓN***



## GENERALIDADES DE LOS GLIOMAS

### EPIDEMIOLOGÍA

Los gliomas se pueden dividir en astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas y tumores de los plexos coroideos. Dentro de estos, los astrocitomas son los más comunes, siendo el GBM el tumor cerebral primario más frecuente, representando más del 50% de la totalidad de los gliomas (Ostrom 2013). La incidencia anual de los gliomas es de aproximadamente 5.7 por 100.000 habitantes y la del GBM se estima en 3-4 casos cada 100.000 habitantes por año (Ostrom 2013). La mediana de supervivencia de los GBM, desde el momento del diagnóstico, es de 12-15 meses, 10-30% de los pacientes están vivos a los dos años del diagnóstico y 5- 17% a los tres años (Stupp y cols. 2005). El GBM representa el 1% del total de casos de cáncer y el 6% de la mortalidad general por cáncer (Louis y cols. 2007). El GBM afecta principalmente a adultos mayores de 65 años (Ohgaki y cols. 2004). La probabilidad de padecer un GBM aumenta con la edad y, por lo tanto, es razonable esperar un aumento de la incidencia en poblaciones en proceso de envejecimiento (Ohgaki y cols. 2004).

### ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN

Aunque se conoce que los gliomas aparecen como consecuencia de alteraciones genéticas que afectan a los mecanismos reguladores del ciclo celular, sin embargo, se desconoce con exactitud si algún carcinógeno está implicado en el origen de estas alteraciones. Se han estudiado, un número considerable de agentes sospechosos, en la mayoría de los casos la causa que inicia el proceso de la génesis permanece desconocida (Samprón y cols. 2017).

Se ha descrito previamente, la asociación de los gliomas con enfermedades hereditarias (Bondy y cols. 1994), la exposición a radiaciones ionizantes en dosis terapéuticas (Garbizu y cols. 2008), el uso de teléfonos móviles y otras fuentes de radiofrecuencia (Kan y cols. 2008), y la exposición a sustancias en el ámbito laboral (DeAngelis 2001). También, se han encontrado diferencias en la incidencia y en el perfil genético del GBM en relación con variables étnicas y geográficas (Wrensch y cols. 2002, Mochizuki y cols. 1999). La incidencia de gliomas es más frecuente en hombres hasta la edad de la menopausia, momento en que la incidencia en ambos sexos se vuelve similar

(McKinley y cols. 2000). Otras posibles asociaciones causales estudiadas son: infecciones (Geissler y Staneczak 1988, Ryan y cols. 1993, Cuomo y cols. 2001), traumatismos craneales (Wrensch y cols. 2000), la epilepsia, las prótesis mamarias, las nitrosaminas, el calcio, el alcohol, los oxidantes de la dieta, los embutidos, la utilización de tinturas y otros cosméticos en el cabello, el tabaco, la exposición a pesticidas, la contaminación relacionada con el tráfico o con el lugar de trabajo (Wrensch y cols. 2000). Aunque algunos de estos agentes fueron capaces de inducir tumores cerebrales en animales de experimentación, estudios en humanos no han podido demostrar una asociación causal.

La clasificación internacional de referencia para los tumores del sistema nervioso central es la descrita por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual está basada en criterios histopatológicos y moleculares. De acuerdo con la quinta edición, los gliomas se clasifican como un tumor neuroepitelial de tipo astrocitario (OMS 2016).

Desde el punto de vista clínico, el GBM se puede clasificar en primario (90% de los casos) y secundario (Ohgaki y cols. 2004). Los primarios se originan de novo sin que exista una lesión precedente conocida, mientras que los secundarios se originan en el seno de un glioma difuso de bajo grado. Se ha demostrado una correlación entre clasificación clínica de los GBM en secundarios y primarios con determinadas alteraciones genéticas (Ohgaki y cols. 2004).

La clasificación funcional basada en la localización de los tumores en zonas elocuentes o no elocuentes, es útil para tomar decisiones terapéuticas, mostrando un valor pronóstico y prediciendo el riesgo de déficits neurológicos adicionales tras la exéresis quirúrgica (Sawaya y cols. 1998).

## **DIAGNOSTICO**

La Resonancia Magnética (RM) es el principal estudio de imagen para la planificación del abordaje quirúrgico, del tratamiento radioterápico y para la cuantificación de la extirpación quirúrgica que es la base del seguimiento (Lacroix y cols. 2001). Los estudios de perfusión por RM (pRM) muestran el volumen de sangre y la vascularización de una zona dentro de una lesión (Keles 1999). El GBM es una lesión altamente vascularizada debido a su potencial angiogénico por lo que la pRM puede tener utilidad en la

caracterización inicial de los gliomas, así, como en la valoración de la respuesta al tratamiento y para el seguimiento en la distinción entre radionecrosis y recidiva (Keles 2004). Otros estudios de ayuda en el diagnóstico y seguimiento mediante RM son los estudios funcionales, la tractografía (Keles y Berger 2004) y la espectroscopia (Hou y cols. 2006).

El diagnóstico definitivo es anatómo-patológico, donde se puede ver un aumento de la celularidad con atipia nuclear, pleomorfismo celular, actividad mitótica, trombosis vasculares, hiperplasia endotelial y necrosis (OMS 2016). La necrosis es un rasgo importante y principal del GBM, dato diferencial frente al astrocitoma anaplásico de grado III de la OMS (Louis 2007).

## **TRATAMIENTO**

El protocolo actual usado en primera línea es el protocolo Stupp (Stupp y cols. 2005), que incluye la extirpación quirúrgica más extensa que sea posible sin ocasionar déficits neurológicos seguida de radioterapia convencional con TMZ concomitante y adyuvante.

Aunque el tratamiento óptimo de los pacientes con GBM incluye la extirpación máxima que sea posible, en ocasiones la cirugía está contraindicada (debido a mala situación clínica o a comorbilidades) o se cree que el riesgo de añadir déficits neurológicos es alto, (tumores profundos y pequeños, multicéntrico, difusos, en áreas elocuentes) y se indica la biopsia estereotáctica o la abstención terapéutica (Keles y Berger 2004). Otras opciones quirúrgicas comprenden, la biopsia estereotáctica con y sin marco, la biopsia abierta, la extirpación subtotal y la extirpación macroscópica completa. Aunque el GBM es, a la vez, una enfermedad localizada y diseminada a través del encéfalo, la cirugía con extirpación completa del tumor cumple un rol central en su tratamiento (Grossman y Batara 2004).

En la actualidad, se debe asumir que todo tratamiento en pacientes con GBM tiene un carácter paliativo, ya que la prolongación de la supervivencia y mejora de la calidad de vida, son, en general modestos (Vaquero y Coca 2004). De forma sencilla, una estimación de la calidad de vida antes, durante y tras el tratamiento de los pacientes puede obtenerse en base a la escala de Karnofsky y similares, sin embargo, una valoración más precisa requiere la utilización de encuestas periódicas a los pacientes en las que se interroga sobre aspectos físicos, psicológicos y sociales (Bampoe y cols. 2000).

**RECIDIVA O PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD Y SU TRATAMIENTO**

Aunque se han descrito casos de pacientes con GBM con supervivencias de 10 años sin progresión tumoral, se asume que todos los GBM finalmente recidivan (Hou y cols. 2006). La enfermedad suele mostrar una progresión clínica a los 4-8 meses del diagnóstico (Stupp y cols. 2005). No existe acuerdo sobre cuál es la forma más adecuada de tratamiento tras la recidiva, en consecuencia, se propone el análisis individualizado de los casos. Se deben tener en cuenta la edad (en tanto que es el factor pronóstico de mayor relevancia), la situación funcional del paciente (medida con el IK), los recursos disponibles, el tratamiento recibido previamente, la localización del tumor, el impacto del tratamiento sobre la calidad de vida y las preferencias del paciente y su familia. Las opciones de tratamiento en la recidiva incluyen la re-intervención con un mayor riesgo de déficit neurológicos postoperatorios añadidos que la primera cirugía (Terasaki y cols. 2007) y la quimioterapia, que es la opción que se utiliza con mayor frecuencia en pacientes con recidiva de GBM y en la cual se suele administrar un fármaco diferente para intentar eludir los mecanismos de resistencia, siendo el tratamiento principal el bevacizumab un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y por tanto, un agente antiangiogénico (Agha y cols 2010). La re-irradiación puede ser una opción para algunos pacientes, especialmente cuando la recidiva es de pequeño volumen (Nieder y cols. 2008).

**FACTORES PRONÓSTICOS EN EL GLIOBASTOMA MULTIFORME**

Los factores pronósticos de mayor relevancia son la edad y la situación funcional (Samprón 2017). También se ha sugerido que algunas características radiológicas pueden tener valor pronóstico independiente en pacientes con GBM (Lacroix y cols. 2001).

El tipo de tratamiento que recibe el paciente es otro determinante de la evolución final. La extirpación quirúrgica macroscópica completa del tumor, la radioterapia focal y la quimioterapia han demostrado prolongar la supervivencia de los pacientes con GBM (Walker y cols. 1978 y 1980, Stupp y cols. 2005).

La presencia, ausencia o modificación de determinadas proteínas, genes, cromosomas y otras moléculas en las células neoplásicas pueden indicar un comportamiento clínico diferente (Simmons 2001, Wrensch y cols. 2002).

## **BASES BIOLÓGICAS Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GBM**

El cáncer es una enfermedad del genoma y especialmente de los genes que integran el sistema del control de la proliferación celular y que coordinan la comunicación con el medio extracelular (TCGA 2008).

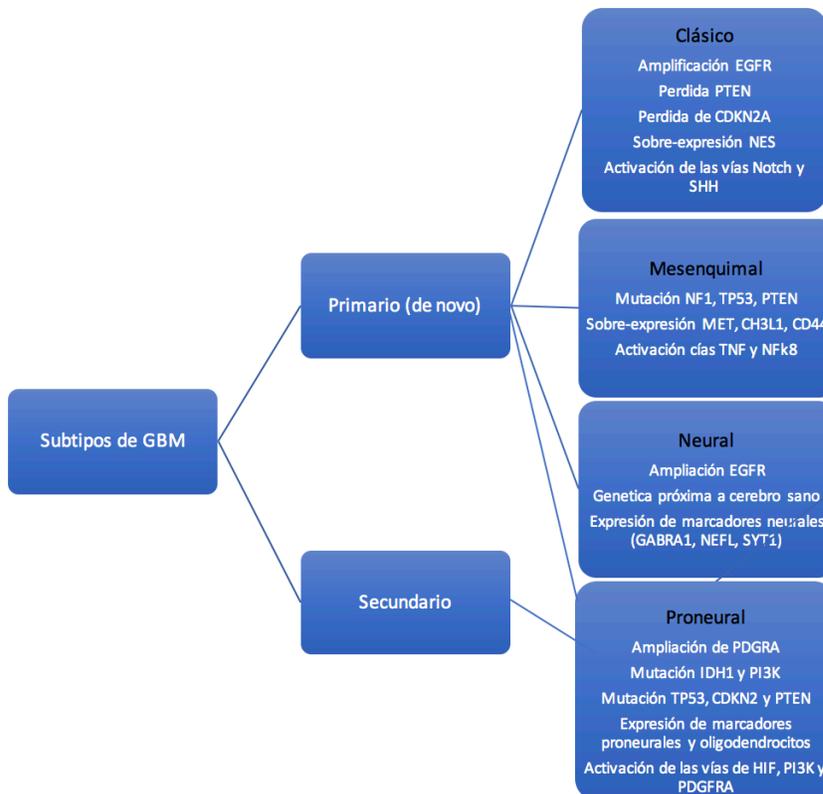
El cáncer puede estar causado, en primer lugar, por mutaciones espontáneas que ocurren al azar a lo largo de la vida del ser humano debido a que los mecanismos de replicación y reparación del ADN son imperfectos (Alberts y cols. 2002). Algunas alteraciones genéticas acontecidas durante los estadios iniciales de la carcinogénesis podrían, a su vez, aumentar la probabilidad de sucesivos cambios en el genoma. Por otro lado, estos cambios genéticos, pueden estar causados o acelerados por diversos factores químicos, físicos o biológicos. Estos cambios pueden ir desde una discreta mutación puntual hasta la adición o la pérdida de varios cromosomas completos. Los genes alterados en el cáncer pertenecen a dos categorías: los oncogenes, inductores de mutaciones expresados de forma dominante, los genes supresores de tumores (GST) expresados de forma recesiva (Hanahan y Weinberg 2000). Sin embargo, no todos los cambios se transmiten en virtud de trastornos en la secuencia del ADN. Otros, sin embargo, inducen la adquisición de nuevos rasgos a través de cambios epigenéticos, que no implican cambios en la secuencia del ADN (Esteller y cols. 2000, Alberts y cols. 2002). La alteración epigenética que lleva a una disfunción en los mecanismos de reparación del ADN frente al daño inducido por agentes alquilantes (como el silenciamiento epigenético mediante metilación de MGMT) ha demostrado tener importancia en la fisiopatología del GBM (Esteller y cols. 2000, Hegi y cols).

Las vías y la secuencia con que la célula, durante el proceso de transformación, adquiere estos rasgos varían entre diferentes tipos tumorales y dentro de un mismo tipo tumoral. Es decir, células indistinguibles desde el punto de vista morfológico, pueden poseer cambios genéticos diferentes, situación muy frecuente en el GBM. Por ejemplo, los gliomas difusos de grado II (de bajo índice de proliferación, pero infiltrantes) se caracterizan desde el punto de vista molecular por la pérdida de función de p53 y el aumento de la actividad de PDGFR (Rao y James 2004). A medida que se transforman en gliomas de alto grado (aproximadamente el 70% lo hace entre los 5-10 años del diagnóstico), adquieren otros trastornos moleculares

en pRB, CDK 4-6 junto con pérdidas de regiones cromosómicas (19q, 11p). Cuando finalmente adquieren el fenotipo de grado IV o GBM, suelen haber perdido el brazo largo del cromosoma 10 y la función de PTEN (Ohgaki y cols. 2004). Los GBM primarios, por el contrario, muestran un incremento de la actividad de EGFR, de la Ciclina D1 y 3, de HDM2 (funcionalmente análogo a la pérdida de p53), pérdidas de parte o todo el cromosoma 10 y pérdida de la función de PTEN (Rao y James 2004).

Hace 10 años el atlas genoma del cáncer (TCGA) se propuso construir el mapa de todas las alteraciones genéticas presentes en cada tipo de cáncer (TCGA 2008). El primer cáncer seleccionado en este proyecto fue el GBM. Se llevaron a cabo análisis moleculares y genéticos que han permitido identificar las mutaciones y alteraciones genéticas más frecuente en el GBM y realizar una clasificación molecular de este tumor. Entre éste y otros diferentes estudios moleculares realizados en fechas similares se puso de manifiesto el destacado grado de heterogeneidad inter-tumoral presente en el GBM (TCGA 2008, Brennan et al. 2013).

En base a los resultados del TCGA se determinó que las alteraciones más frecuentes en GBM afectaban principalmente a 3 vías de señalización celular: la vía de señalización de los receptores celulares de tipo tirosina quinasa (TK), la vía de p53 y la de Retinoblastoma (Rb) (Brennan y cols 2013). De acuerdo al TCGA, los GBM se han clasificado en 4 subtipos moleculares teniendo en cuenta las alteraciones genéticas y epigenéticas, la respuesta a los tratamientos y el pronóstico (Verhaak y cols 2010). Según esta clasificación, se han descrito los siguientes cuatro subtipos de GBM: proneural, neural, clásico y mesenquimal (Figura1). Las alteraciones más frecuentes de cada subtipo son: proneural, sobre-expresión de PDGFR y mutaciones de IDH1 y TP53; neural: expresión aumentada de NEFL y GABRA1; clásico: sobre-expresión de EGFR; y mesenquimal, inactivación de NF1 y PTEN (Verhaak y cols 2010, Morokoff y cols 2015). La relevancia de estos subgrupos viene dada por la supervivencia y la distinta respuesta a los tratamientos convencionales actuales, siendo los subtipos clásico y mesenquimal en los que la efectividad de las terapias es mayor (Verhaak y cols 2010b).



**Figura 1.** Clasificación del GBM en función de sus alteraciones más destacables. Adaptado de Van Meir y cols2010.

Más recientemente se han identificado otras mutaciones fundamentales para entender la biología del GBM. El IDH se encuentra mutado en aproximadamente el 80% de astrocitomas difusos y anaplásicos, así como GBM secundarios. En estos últimos, varios equipos basados en la mutación del IDH y el estado del ATRX, combinado con otros biomarcadores clásicos, refinaron la clasificación molecular de los gliomas en adultos, proporcionando una herramienta diagnóstica y pronóstica (Cai 2016). Estos estudios apoyaron el desarrollo de una nueva clasificación molecular basada en la alteración del IDH1 y la pérdida del ATRX, ya que las características clínicas y el pronóstico de los pacientes con astrocitomas de alto y bajo grado, no se reflejan con precisión en las clasificaciones histológicas (Cai 2016). En base a lo anterior y a la información obtenida gracias a los análisis moleculares y genéticos realizados en el último periodo, se ha actualizado la clasificación de la OMS para mejorar y hacer más precisa el diagnóstico de los GBM. Esta nueva clasificación (Tabla 1) tiene en cuenta tanto las características moleculares como las histológicas, por lo que integra los parámetros genotípicos y fenotípicos y clasifica los GBM dentro de los

tumores astrocíticos y oligodendrocíticos en base a la mutación de IDH, en IDH wild type, IDH mutante y un tercer grupo como GBM NOS, en los que el diagnóstico es reservado por la imposibilidad de evaluar completamente IDH (Louis y cols 2016).

CARACTERÍSTICAS	GBM IDH-wild type	GBM IDH-mutado
Lesión precursora	GBM primario, de novo	GBM secundario, a partir de astrocitoma difuso o anaplásico
Frecuencia	90%	10%
Edad media al diagnóstico	62 años	44 años
Ratio hombre:mujer	1.4:1	1.05:1
Mutaciones principales	TERT promotor 72% TP53 27% Amplificación EGFR 35% PTEN 24%	TERT promotor 26% TP53 81% ATRX 71%
Supervivencia media	15 meses	31 meses

**Tabla 1.** Tipos de GBM en base a la clasificación actual de la OMS. Adaptado de Louis y cols 2016.

Estos estudios en su conjunto han identificado que el GBM es una enfermedad originada en alteraciones del genoma que consisten en cambios en la secuencia del ADN (mutaciones), aumento del número de copias de los genes normales, aberraciones cromosómicas y cambios epigenéticos.

### VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CON IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS EN EL GBM.

El conocimiento de las principales vías de señalización alteradas en el GBM (EGFR, PDGFR, PTEN, p53, p16, p14, pRB) se ha seguido del desarrollo de pequeñas moléculas y anticuerpos monoclonales diseñadas para modular o suprimir las señales de proliferación, invasión, angiogénesis y resistencia a la apoptosis. Aunque todas las vías estudiadas pueden ser susceptibles de modulación farmacológica, las principales vías de señalización o estructuras moleculares que han suscitado más interés terapéutico hasta el momento en GBM son el VEGFR, los receptores de tipo tirosina quinasa, la proteína Ras y mTOR. La inhibición de este último supliría parte de la función de PTEN (Rao y James 2004, Furnari y cols. 2007, Cloughesy y cols. 2008). Sin embargo, los resultados preliminares parecen indicar que la interrupción de una única vía se muestra inefectiva y que es necesario el diseño de estrategias dirigidas a modular varias vías simultáneamente. Por otro lado, dada la variabilidad biológica del GBM, otros investigadores proponen el diseño individualizado del tratamiento en base al estudio molecular del tumor (Cloughesy y cols. 2008).

## HETEROGENEIDAD CELULAR DEL GBM

No existe un consenso en cuanto al tipo celular que da origen al GBM. Se ha sugerido que los cambios acontecidos durante la gliomagénesis pueden ocurrir en astrocitos y oligodendrocitos maduros, causando la desdiferenciación de estas células y convirtiéndolas en el origen de los tumores. Esta hipótesis, está fundamentada en ciertas semejanzas morfológicas con la célula neoplásica y tal vez en cierta lógica de que cada tipo glial debe dar origen a algún tipo de tumor (Quinones-Hinojosa y cols. 2006). El cerebro humano adulto contiene una población de células madres en el área subventricular, en la sustancia blanca subcortical y en el hipocampo (Nunes y cols. 2003, Quinones-Hinojosa y cols. 2006 y 2007). Las células madres neurales tienen la capacidad de migrar, multiplicarse indefinidamente y diferenciarse en células progenitoras neuronales y gliales (Sanai y Berger 2008). Estas células progenitoras comparten algunas de sus características con la célula neoplásica (Zhang y Fine 2006).

No todas las células neoplásicas presentes en el tumor son capaces de proliferar. Dentro de la elevada heterogeneidad celular, se ha hallado una subpoblación de células tumorales con características de célula madre, las denominadas células madre tumorales (CMT) que son capaces de generar un tumor con las características de la neoplasia original cuando son trasplantados en un ratón inmunodeprimido (Singh y cols. 2003 y 2004, Yuan y cols. 2004, Liu y cols. 2013, Sanai y Berger 2008). Este concepto distingue una jerarquía celular en la que las CMT constituyen el origen del tumor y son una gran fuente de heterogeneidad debido a que tienen capacidad de auto-renovación indefinida y elevada plasticidad, pudiendo producir células con diferentes grados de diferenciación y también experimentar procesos de transdiferenciación dando lugar a células altamente invasivas con fenotipo mesenquimal (Liu y cols 2014, Ricci-Vitiani 2008) o incluso células del estroma como pericitos o células endoteliales necesarias para su mantenimiento (Cheng y cols 2013). Debido a esto, las CMT constituyen dianas críticas en el tratamiento del cáncer, pues se ha postulado que son las responsables de la iniciación, el mantenimiento y la progresión tumoral (Cheng y cols 2013).

Como se describió previamente, además de células cancerosas, los tumores contienen otros tipos celulares como células del sistema inmune, células

endoteliales de los vasos sanguíneos circundantes y células del estroma como fibroblastos o pericitos, las cuales conforman el denominado microambiente tumoral, un ecosistema complejo en el que las células tumorales y las células no tumorales se comunican e influyen entre sí (Junttila y de Sauvage 2013). Se conoce que el efecto de este microambiente es muy importante para la progresión del tumor.

Es por esto que, diferentes mecanismos contribuyen a la heterogeneidad intra-tumoral, incluyendo mutaciones genéticas, el microambiente y la existencia de subpoblaciones de células tumorales multipotenciales con capacidad de auto-renovación (CMT).

## **REGULADORES DE LA HETEROGENEIDAD CELULAR**

### **Factores de transcripción SOX**

Los genes SOX, también conocidos como SRY-box son unos factores de transcripción cuya función es esencial en el mantenimiento de la auto-renovación de las células madre embrionarias. En el desarrollo embrionario los factores SOX desempeñan un papel importante durante la gastrulación temprana, en la determinación del sexo, la hematopoyesis o la neurogénesis. Durante estos procesos su función es necesaria para el mantenimiento de la población de células madre y para determinar el compromiso de determinadas poblaciones celulares en el desarrollo de tejidos diferenciados, destacando el papel prominente que desarrollan en el SNC.

Se cree que genes implicados en la progresión tumoral podrían coincidir con genes reguladores del desarrollo embrionario, por su actividad en las células madre y los nexos de éstas con el cáncer. En este sentido, los factores de transcripción SOX son claros candidatos que están siendo implicados en distintos tipos de cáncer (Castillo y Sánchez-Céspedes 2012). Recientemente se ha asociado a los genes de la familia SOX con el mantenimiento del estado indiferenciado de la CMT en diversos tejidos, incluido el cerebro. Varios grupos han detectado el incremento de los niveles de SOX 1, 2 y 9 en las biopsias de pacientes con GBM, lo cual se ha asociado a un peor pronóstico (Garros-Regulez 2016, Garcia 2017).

### **Transductor de señales y activador de la transcripción (STAT)**

Esta vía de señalización es importante en el desarrollo, donde participa en el mantenimiento en la hematopoyesis y neurogénesis (Stine y Matunis, 2013). STAT3 además está implicado en la regulación del ciclo celular, la

supervivencia celular, así como en la auto-renovación (Raz y cols. 1999). STAT3 además tiene un papel fundamental en la inducción y mantenimiento del microambiente inflamatorio, el cual ha sido relacionado con la iniciación y progresión tumoral (Catlett-Falcone y cols. 1999). Asimismo, se ha descrito que STAT3 regula positivamente la expresión de genes pro-angiogénicos y de supervivencia celular, los cuales promueven el crecimiento tumoral (Wang y cols 2009). Reforzando estos datos clínicos, se ha descrito que STAT3 está sobre-activado en GBM (Rahaman y cols 2002).

### **Gen de la leucemia promielocítica (PML)**

En distintas líneas celulares tumorales y fibroblastos se ha descrito que los niveles de STAT3 activado correlacionan con la expresión de PML (Hubackova y cols. 2012), un regulador de la expresión génica que se localiza en los cuerpos nucleares y que ha sido vinculado con el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y las células iniciadoras de la leucemia mieloide crónica (Ito y cols. 2008).

## REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL GBM

Las modificaciones epigenéticas, incluyendo la metilación del ADN y la acetilación de histonas, afectan a muchos aspectos de la biología cromosómica, incluyendo la regulación de un gran número de genes (Kiefer 2007). Muchos genes supresores de tumor con frecuencia son silenciados por mecanismos epigenéticos, contribuyendo a la oncogénesis. (Yu 2008).

### LONG NON CODING RNA

El genoma humano está descrito como numerosos locus de transcripción que están separados por tramos largos de espacio inter-genético, la mayoría son transcritos como complejas redes entrelazadas de transcripciones sentido y antisentido solapadas que a veces incluyen genes que codifican proteínas (Kapranov 2007). Las secuencias genómicas entre estos locus transcripcionales a menudo son compartidos con un número de diferentes transcriptores tanto codificadores como no codificadores (Birney 2007). Los long non coding RNAs (LncRNAs) son cadenas transcriptoras de ARN mayores de 200 nucleótidos que no codifican proteína. Este límite arbitrario los diferencia de los microRNA reguladores (miRNAs), RNA cortos (siRNAs) y de otros RNA cortos (Perkel 2013). Recientemente se ha encontrado que aproximadamente 1/5 parte de las transcripciones a lo largo del genoma humano están asociadas con genes codificadores de proteínas (Kapranov 2007), lo que se traduce en que los LncRNAs representan al menos unas 4 veces más que las secuencias de ARN codificadoras de proteínas. También, se ha descrito que el cerebro y el sistema nervioso central expresan mayor cantidad de LncRNAs que cualquier otro tejido del cuerpo (Derrien 2012).

### Organización genómica y funciones de los LncRNAs

La evidencia sugiere que la mayoría de éstos son funcionales (Mercer 2009), aunque solo una pequeña parte ha demostrado ser biológicamente relevante. A junio de 2014, se han anotado 197 LncRNAs funcionales en el LncRNADB (una base de datos de la literatura que describe LncRNAs) (Amaral 2010) y la mayoría (118) fueron descritos en el ser humano.

Los LncRNAs se han visto involucrados en la transcripción específica de los genes (Goodrich 2006), inactivación del cromosoma X (XIST) (Wutz 2007) y la regulación de modificaciones de los telómeros (Schoeftner 2008). También se

han descrito LncRNAs que se transcriben a partir de secuencias de ADN no codificante entre los genes codificantes de proteínas, llamados LncRNAs inter-genéticos LincRNA (Hesman Saey 2011) involucrados en la diferenciación de células madre embionarias y en la regulación de la pluripotencialidad.

La capacidad de los LncRNAs para regular los genes codificantes de proteínas puede contribuir a la enfermedad, ya que la alteración en la función un gen, se traduce en la alteración de una proteína con importancia clínica. Se ha identificado que algunos LncRNAs se expresan de forma aberrante en algunas enfermedades. La primera vez que se describió la alteración de un LncRNA en relación con la enfermedad fue con la demencia de Alzheimer y el envejecimiento, encontrando que la expresión LncRNA BC200 se encontraba disminuida (Lukiw y cols 1992). Posteriormente, se relacionó la sobre-expresión del LncRNA PRINS con la psoriasis (Sunkoly 2005), así mismo, el LncRNA MIAT (del inglés myocardial infarction associated transcript) y el LncRNA ANRIL con el infarto de miocardio y la aterosclerosis (Ishii 2006, Pasmant 2007), además que, mediante la metilación del ADN contribuían en el desarrollo de la  $\beta$ -talasemia (Tufarelli 2003).

### **Papel de los LncRNAs en la oncogénesis.**

Se cree que los LncRNAs influyen en la reprogramación de células diferenciadas en células madre pluripotenciales (Galasso 2014), que juegan un papel crítico para el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre en múltiples tejidos tanto durante el desarrollo embrionario, así como también se destaca su acción en el sistema nervioso central (Yue 2015, Pal 2010). Por consiguiente, no es sorprendente que, en los últimos años, varios grupos han asociado su actividad alterada con la oncogénesis.

El estudio del genoma ha mostrado que muchas regiones transcriptoras no codificantes exhiben distintos perfiles en varios tipos de cáncer humano (Calin 2007). Sin embargo, su papel en la oncogénesis aún es relativamente desconocido, ya que, se han descrito niveles de expresión de los LncRNAs tanto elevados como disminuidos, en distintos tipos de cáncer (Mercer 2009, Yan Y 2017). Por ejemplo, la sobreexpresión de los LncRNAs HIS-1 y BIC se ha relacionado con la oncogénesis en el linfoma de células B (Eis 2005, Li 1997). En los tumores de próstata, la sobre-expresión del LncRNA PCGEM1, se correlacionó con un aumento de la proliferación y la formación de colonias,

lo que sugiere una participación en la regulación del crecimiento celular (Fu 2006). El lncRNA MALAT1 (también conocido como NEAT2) fue originalmente identificado como un lncRNA sobreexpresado en la metástasis del cáncer no microcítico de pulmón y su sobre-expresión se ha correlacionado clínicamente como un marcador pronóstico (Fu 2006). Por otro lado, se ha demostrado que la transcripción y la expresión de elementos no codificantes, están disminuidos en la leucemia humana y que esto puede contribuir a la oncogénesis, disminuyendo la apoptosis y, posteriormente, la ampliación del número de células malignas (Calin 2007). Algunos de estos lncRNAs diferencialmente expresados en cáncer se encuentran en regiones genómicas cercanas a importantes reguladores del cáncer, lo que sugiere que su actividad puede desarrollarse mediante la modulación de estos genes clave en la oncogénesis.

También se ha observado que la expresión de los lncRNAs afecta a la heterogeneidad celular y se ha observado alterada su expresión en las CMTs de diferentes tipos de cáncer, entre ellos, el cerebro (Uyeno 1996, Han 2012, Enciso-Mora 2013, Park 2014, Yan 2015, Yue 2016), colorrectal (Sánchez Y 2014), seno (LeBlanc 2015), pulmón (Barsyte-Lovejoy 2006), hepatocelular (Yuan J 2014), próstata (Fu 2006) y leucemia (Calin 2007), y esta actividad está asociada con fallos en importantes procesos de la fisiopatología del cáncer.

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, se demostró que un grupo de lncRNAs estaban disminuidos en el cáncer colorrectal, aunque los cambios sólo alcanzaron significación estadística ( $P < 0,01$ ) para 7 de 12 lncRNAs (Sánchez y cols. 2014). Es importante destacar que las muestras que exhibieron niveles disminuidos de este patrón de lncRNAs, se asociaron a un mal pronóstico clínico, demostrando que estos lncRNAs constituyen un patrón supresor de tumores (Sánchez y cols. 2014). También, se demostró la participación de los lncRNA1 y lncRNA10 en la supresión tumoral de p53 en células de cáncer colorrectal (Sánchez y cols. 2014).

### **Papel de los lncRNAs en la gliomagénesis.**

También se ha relacionado a los lncRNAs con la oncogénesis de los gliomas (Ma y cols 2016). Se ha descrito que su contribución en la gliomagénesis se produce a través de la regulación genética y epigenética (Katsushima 2014, Li J 2016, Ke 2015, Qureshi 2013) de importantes procesos en la iniciación

(Zhang 2015), mantenimiento (Jiang 2016) o progresión de las GCSs (Zhang XQ 2014), así como de otros fenotipos relacionados con malignidad como el aumento de la proliferación (Wang P 2012, Wang 2016, Barsyte-Lovejoy 2006), mayor migración e invasión (Monticone 2012, Jiang 2016, Cai 2015, Ma J 2016, Shi Y 2014), la auto-renovación (Zhang 2015) y la angiogénesis (Jiang 2016)

No hay consenso acerca del papel de los LncRNAs como oncogén o gen supresor de tumor. En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de LncRNAs publicados, así como su perfil de expresión.

Autor	LncRNA sobreexpresado	LncRNA disminuido
Guo 2015	linc-POU3F3	
Wang P 2012	MEG3	
Jiang 2016	H19	
Wang 2016	HOXA11-AS	
Kiang 2015	HOTAIR	
Zhang X 2012, Ellis 2012	CRNDE	
Yao 2015	XIST	
Liu Q 2015	NEAT1	
Liu H 2015	SPRY4-IT1	
Zhu 2016	HULC	
Zhang XQ 2013		ASLNC22381
Zhang XQ 2014		KIAA0495
Wang P 2015		CASC2
Liu Q 2015, Li J 2016		TUG1
Pickard y Williams 2015		GAS5
Yao 2014		ADAMTS9-AS2
Xiang y cols 2016 //Han y cols 2016a	NEAT2	NEAT2

**Tabla 2.** Perfiles de expresión de algunos LncRNAs en muestras y líneas celulares de glioma.

Algunos autores han publicado niveles sobre-expresados de los LncRNAs como son el linc-POU3F3 (Guo 2015), MEG3 (Wang P 2012), H19 (Jiang 2016), HOXA11-AS (Wang 2016). Otro ejemplo es el bien conocido LncRNA HOTAIR, que se encuentra sobre-expresado en el cáncer de mama y en el teratoma rabdoide y que participa principalmente en el proceso de remodelado de la cromatina, se ha visto sobre-expresado en muestras y líneas celulares de glioma (Kiang y cols 2015) y se encontró asociado con la génesis, el desarrollo y la diferenciación de los gliomas (Bian y cols 2016, Zhang 2015, Chakravadhanula 2014).

Se ha demostrado que el papel del LncRNA H19 se ha relacionado con c-Myc, ya que éste induce la expresión del LncRNA H19, potenciando así la gliomagénesis (Barsyte-Lovejoy 2006). Además, sirviendo como un precursor del miR-675, H19 podría modular la progresión del glioma a través de la expresión de la caderina 13 asociada al cáncer (CDH13), que es el objetivo

directo de miR-675 (Shi 2014), regulando la proliferación y migración de las GSCs mediante la inhibición de la expresión de CDK6, que es un regulador del ciclo celular y que participa en el desarrollo del glioma (Rader 2013, Sherr 2016). Por otra parte, el silenciamiento de H19 demostró una mayor eficacia de la TMZ en las líneas celulares de GBM U87 y U251 (Li W 2016).

En un estudio de 2012, el LncRNA CRNDE (del inglés Colorectal neoplasia differentially expressed) se identificó como el LncRNA más sobre-expresado en glioma, entre los 129 LncRNAs estudiados (Zhang X y cols 2012, Ellis 2012). Este LncRNA potencia el desarrollo del glioma posiblemente al mantener el estado indiferenciado de las GSCs, así como lo hace en los precursores neurales (Ellis 2012, Watkins y Sontheimer 2012). Este hallazgo concuerda con otro estudio a posteriori (Zheng J 2015) en el que se demostró un vínculo directo entre la sobre-expresión de CRNDE y las GSCs. El CRNDE podría regular negativamente miR-186 y disminuir la expresión de los genes XIAP (inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X) y PAK7, contribuyendo así a las características malignas de las GSCs (Zheng J 2015). Además de estas observaciones, ese mismo año (Wang Y 2015) demostró que la sobre-expresión del CRNDE promueve el crecimiento de células de glioma in vitro e in vivo a través de la vía mTOR (del inglés mammalian target of rapamycin). Su expresión se ve afectada por modificaciones epigenéticas, incluyendo la acetilación de histonas en las regiones promotoras (Wang Y 2015). Recientemente, se publicó que el CRNDE promueve el comportamiento maligno, al atenuar el eje de miR-384/PIWIL4 (del inglés piwi- like RNA-mediated gene silencing 4). En resumen, el silenciamiento de CRNDE puede disminuir el nivel de proteína de PIWIL4, un objetivo de miR-384, que lleva a la regresión del glioma in vivo (Zheng J 2016). En general, estos resultados revelaron que el CRNDE podría potenciar la gliomagénesis a través de múltiples vías de señalización.

El lncRNA XIST, un producto del gen XIST es un regulador de la inactivación del cromosoma X en mamíferos, función mediada por la proteína de unión de ARN de alta afinidad ATRX (del inglés alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked). Recientemente, se demostró que la expresión de XIST está sobre-expresada en las muestras de glioma y GSCs. Por lo tanto, su inhibición ejerce una función supresora de tumores en GSCs (Yao 2015).

El lncRNA NEAT1 (del inglés Nuclear enriched abundant transcript 1) se encontró regulado positivamente tras la inducción del daño del ADN con resveratrol, en muestras de glioma y en las líneas celulares de glioma U251 y U87 (Liu Q 2015). NEAT1 promueve la gliomagénesis mediante la regulación de la proliferación, invasión y migración de las GSCs (Zhen 2016). Además, se ha publicado que la expresión aberrante de NEAT1 tiene una correlación negativa con el pronóstico de pacientes con GBM (He 2016).

Recientemente, se ha demostrado que la expresión del lncRNA SPRY4-IT1 se encuentra elevada en muestras de glioma y líneas celulares de glioma en comparación con donantes sanos (Liu H 2015). La transición de tejido epitelial a mesenquimal es un evento molecular relevante en los GBM, y un proceso esencial en la diseminación tumoral y el comportamiento metastásico (Kahlert et al., 2013). Liu H y cols demostraron que el silenciamiento del lncRNA SPRY4-IT1 podría suprimir el fenotipo de esta transición en GSCs en las líneas celulares de glioma U251 y SF295 (Liu H 2015).

También, Zhu y cols publicaron que el lncRNA HULC (del inglés Highly up-regulated in liver cáncer) tiene una importante función biológica en los gliomas humanos (Zhu y cols 2016). El HULC puede promover la angiogénesis, una característica distintiva de los gliomas de alto grado (astrocitoma anaplásico y GBM). Además, se ha visto que la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR está implicada en la respuesta inducida por HULC (Zhu y cols 2016).

Clínicamente, se ha publicado que los niveles elevados de un patrón de lncRNAs se correlacionan con un subgrupo de pacientes con menor media de supervivencia y que forman parte de un patrón de marcadores de CMT que se ha asociado con un peor pronóstico de los pacientes (Hu 2016, Zhi 2015, Wibom 2015, Ma 2015, Engström 2012, Zhang X 2012, Zhang XQ 2013, Zhang JX 2013).

Por el contrario, otros abogan por el silenciamiento de los lncRNAs como origen de la patogenia (Barsyte-Lovejoy 2006). Así, se ha descrito que el nivel de expresión de algunos lncRNAs se encuentra disminuido en muestras y líneas celulares de glioma, tales como los lncRNAs ASLNC22381 y el KIAA0495 (Zhang XQ y cols 2013 y 2014).

Recientemente, se ha publicado que la expresión de CASC2 (del inglés *cáncer susceptibility candidate 2*), está disminuida tanto en las muestras de glioma, así como en las líneas celulares de glioma U251 y U87 (Wang P 2015). De acuerdo con estudios previos en otros tumores, la sobre-expresión de CASC2 podría inhibir la malignidad de las GSCs disminuyendo la proliferación y la migración y promoviendo de forma correspondiente la apoptosis celular. Los ensayos de extracción ARN confirmaron que el papel supresor de tumores de CASC2 está mediado principalmente por la regulación negativa de miR-21 (Wang P 2015). Previamente en la literatura, se ha publicado que miR-21 actúa como un oncogén, y la inhibición de miR-21 podría ser una nueva estrategia terapéutica específica y efectiva en los gliomas (Belter y cols 2016).

El LncRNA TUG1 (*Taurine up-regulated gene 1*) se ha visto regulado negativamente en respuesta a la necrosis inducida en líneas celulares de glioma (Liu Q 2015). Posteriormente se demostró que TUG1 actúa como un supresor tumoral en el glioma, y está correlacionado negativamente con el grado de glioma, el tamaño del tumor y la supervivencia global (Li J 2016). En este estudio, se demostró que TUG1 induce la apoptosis de GSCs a través de vías intrínsecas mediadas por caspasas, en lugar de la vía antiapoptótica mediada por Bcl-2 (Li J 2016).

Estudios recientes han informado que GAS5 (del inglés *Growth arrest-specific 5*) regula negativamente el crecimiento de líneas celulares de cáncer *in vitro* e *in vivo*, incluyendo los gliomas (Pickard y Williams 2015). El GAS5 ejerce efectos complementarios sobre la proliferación celular (inhibitoria) y la apoptosis (estimulante), y en conjunto, estos mecanismos celulares probablemente forman la base de su acción de supresión tumoral (Yin 2014, Shi X 2015). La regulación positiva de Gas5 aumenta la expresión del supresor de tumores bmf (factor modificador de Bcl-2) (Zhao 2015). Además, la sobre-expresión de GAS5 podría mejorar la respuesta celular al erlotinib, un inhibidor de tirosina quinasa utilizado como tratamiento de segunda línea en el manejo de los gliomas (Garcia-Claver 2013). También, la inducción de GAS5 se detecta durante la apoptosis inducida, en líneas celulares de glioma (Liu Q. 2015).

Los genes de la familia ADAMTS9-AS2 juegan un papel crítico en la regulación epigenética, afectando etapas iniciales del desarrollo. Recientemente, el LncRNA ADAMTS9-AS2 se ha descrito como un potencial marcador

pronóstico y diana terapéutica y en los gliomas. El ADAMTS9-AS2 funciona como un supresor de tumores, que es regulado negativamente en las muestras de glioma, y su expresión está correlacionada negativamente con el grado tumoral y el pronóstico. También, se ha publicado que la inhibición del DNMT1 mejora notablemente la expresión de ADAMTS9-AS2, inhibiendo la migración celular en gliomas (Yao y cols 2014).

Como hemos visto, algunos LncRNAs actúan como oncogén, mientras que otros lo hacen como genes supresores de tumor. Sin embargo, también se ha descrito que los LncRNA podrían actuar en ambos sentidos. En trabajos recientes se ha descrito el papel como supresor de tumor de NEAT2 (del inglés Nuclear enriched abundant transcript 2) en la gliomagénesis. La expresión de NEAT2 es más baja en las muestras de glioma en comparación con el tejido cerebral normal. El NEAT2 inhibe la proliferación e invasión de las líneas celulares U87 y U251 mediante la inactivación de la vía de señalización ERK/MAPK y la regulación negativa de MMP2 (metaloproteinasa de matriz 2) (Han y cols 2016a). En contraste, otros investigadores mostraron un papel contrario del NEAT2 en los gliomas (Xiang y cols 2016). Según sus observaciones, la expresión de NEAT2 esta aumentada significativamente en las muestras de glioma, así como en las líneas celulares U87 y U251 (Xiang y cols 2016). Sorprendentemente, las GSCs de las líneas celulares U87, SHG44 y SHG139 expresaron mayores niveles de NEAT2 en comparación con sus líneas parentales (Han y cols 2016a). Además, encontraron que la regulación negativa de NEAT2 suprime la expresión de SOX2 en la línea celular SHG139S, mientras que la regulación negativa de NEAT2 disminuye la proliferación de células SHG139S (Han y cols 2016b). Por lo tanto, NEAT2 juega un papel complejo en gliomagénesis como regulador positivo y negativo, posiblemente basado en su contexto celular específico.

Recientemente, algunos autores, han propuesto diferentes clasificaciones de los gliomas basados en los perfiles de expresión de diferentes LncRNAs (Li R 2014, Zhang X 2012, Chen 2015) demostrando diferentes pronósticos en la evolución de los pacientes. Por tanto, colectivamente, los LncRNAs han ganado valor como biomarcadores para fines clínicos. Las evidencias indicadas demuestran que la evaluación de la actividad de los LncRNAs en el GBM, representa un marcador pronóstico útil y que la actuación sobre la actividad de estos marcadores podría ofrecer una novedosa y prometedora estrategia terapéutica (Schmitt y Chang, 2016).



# ***OBJETIVOS***



El objetivo principal de este trabajo es definir el impacto clínico de un patrón de LncRNAs en los gliomas, en especial del GBM, mediante la caracterización de su expresión en muestras tumorales derivadas de una cohorte del Hospital Universitario Donostia.

Para el desarrollo del estudio, hemos desglosado el objetivo general del trabajo en los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1: Determinación de expresión del patrón de LncRNA en gliomas derivados de pacientes del Hospital Universitario Donostia.

- a) Expresión en las muestras de gliomas grado I a III.
- b) Expresión en las muestras de GBM.
- c) Comparar su expresión con muestras de cerebro sano y peritumoral.

Objetivo 2: Correlación con datos clínicos

- a) Asociación con información clínica y radiológica de los pacientes con gliomas.
- b) Asociación con biomarcadores de GBM (EGFR y Ki67).
- c) Asociación con actividad de p53.
- d) Asociación con marcadores moleculares de células madre tumorales (SOX, PML, STAT3).
- e) Análisis estadístico global de estos marcadores.

Objetivo 3: Asociación con Supervivencia de pacientes

- a) Correlación del patrón de LncRNA con supervivencia de los pacientes.
- b) Identificación de los LncRNAs más relevantes con valor diagnóstico y pronóstico.

Objetivo 4: Determinación de la función de LncRNAs en células de glioma.

- a) Estudios de proliferación celular.
- b) Cuantificación de células madre tumorales derivadas de líneas convencionales.



# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

# ***DISCUSIÓN***



Los gliomas son los tumores primarios cerebrales más frecuentes, entre ellos destaca por su malignidad y agresividad el GBM. Este último se caracteriza por una extensa heterogeneidad inter-tumoral entre los tumores de diferentes pacientes que se extiende a cada tumor de manera individual, ya que existe también amplia heterogeneidad molecular, genética, epigenética y celular dentro de un mismo caso (intra-tumoral). Esta heterogeneidad a múltiples niveles es un fenómeno que dificulta de manera significativa el correcto diagnóstico de la enfermedad y un abordaje terapéutico efectivo, pues no todos los tumores (y células dentro de un mismo tumor) presentan la misma susceptibilidad a los tratamientos actuales y en consecuencia se producen fenómenos de resistencia a fármacos y recurrencia tumoral.

En los últimos años se han llevado a cabo diferentes análisis y estrategias moleculares y genéticas de secuenciación masiva que han permitido identificar las mutaciones y alteraciones genéticas más frecuentes en GBM y realizar una clasificación molecular de este tumor. Siendo este un gran avance, existen todavía limitaciones y un gran desconocimiento sobre el impacto que tiene la epigenética en la patobiología del GBM.

En este estudio, hemos encontrado que la expresión de un patrón de LncRNAs, previamente descrito como supresor tumoral en cáncer de colon, parece estar aumentado en los gliomas de bajo grado, y sus niveles disminuyen a medida que se incrementa el grado tumoral. Nuestros estudios realizados en una cohorte de 43 pacientes del Hospital Donostia de San Sebastián, demuestran que estos LncRNAs de estudio, cuando relacionamos sus niveles de expresión en el GBM, observamos que se encuentran expresados diferencialmente, identificando que las biopsias con niveles de LncRNA 1, 5 y 10 más bajos se asocian con el subgrupo de pacientes con una supervivencia global mediana más baja, aunque estos resultados no llegan a ser estadísticamente significativos. Cuando se analiza la asociación de la expresión de los LncRNAs con otras variables clínicas pronósticas diferentes de la supervivencia se observó que existe correlación de los LncRNAs con el sexo femenino y la localización del tumor frontal o temporal y en zona no elocuente, e inversamente con la expresión de SOX1, SOX2 y SOX9, marcadores de células madre tumorales y genes cuya elevada expresión se ha asociado con peor pronóstico. En línea con estos datos obtenidos en muestras clínicas, hemos observado que la expresión de los LncRNAs disminuye en la población de células madre de glioma derivada de la línea

celular U87MG cuando se compara con la línea parental. Estos resultados sugieren que el patrón de LncRNAs identificado constituye una firma supresora de la progresión de la gliomagenesis y su expresión puede ser útil como biomarcador diagnóstico y pronóstico en la clínica del GBM.

Además, se han realizado ensayos funcionales de inhibición de 2 de estos LncRNAs en cultivos celulares (LncRNA1 y 10) mediante ASOs observando que su silenciamiento incrementa la capacidad proliferativa y la actividad de auto-renovación de las células de glioma. Estos ensayos demuestran la relevancia de este patrón de LncRNAs en la patobiología del GBM y confirman su función como mecanismo defensivo en este tipo de cáncer.

#### PARAMETROS CLÍNICOS DE LOS GLIOMAS Y EL GBM

En relación con el pronóstico de los pacientes con glioma, es de sobra conocido que su evolución es desfavorable con el avance en el grado del glioma (Louis 2016), evidencia que también se observó en nuestro estudio ya que la supervivencia del paciente disminuyó con el incremento de grado tumoral yendo desde 77 meses en glioma grado II, a 49 meses en glioma grado III y 17 en GBM. En este último tipo tumoral existe cierta variación en la supervivencia y algunos pacientes muestran una supervivencia prolongada ya que, en la actualidad, no es posible predecir la evolución de cada paciente en particular, aunque se puede establecer una aproximación en base a ciertas características del paciente y del tumor.

Entre los factores pronósticos de mayor relevancia se encuentran la edad y la situación funcional medida con el índice de Karnofsky (Samprón y cols 2017). Estudios previos han demostrado que la supervivencia a los 18 meses del diagnóstico del GBM de los pacientes menores de 40 años es del 50%, cifra que descienda al 20% en aquellos con edades comprendidas entre los 40 y 60 años y al 10% en los mayores de 60 años (Walker y cols.1980, Grossman 2004). Otros han publicado una supervivencia a 18 meses de diagnóstico del 34% para pacientes con IK mayor de 70 (pacientes independientes para las actividades de la vida diaria) y de 13% en situaciones más desfavorables (Grossman 2004). Este punto de corte (IK 70) es arbitrario y varía entre los diferentes estudios y es el seguido en nuestro análisis. En nuestro estudio, al correlacionar estas dos variables con la supervivencia, hemos encontrado que, la edad mayor de 65 años multiplica el riesgo de muerte por 3.5 veces. Consecuentemente, por cada año más de vida a partir de los 65 años, el riesgo agregado de muerte es de 1.04. Similarmente a lo descrito

previamente, hemos encontrado que el IK menor de 70 condiciona una peor supervivencia.

En concordancia con la literatura (Grossman 2004), no hemos encontrado correlación del sexo de los pacientes con la supervivencia. Sin embargo, hemos visto que, para los 3 LncRNAs de estudio, la alteración en la expresión fue predominante en las mujeres, aunque estas diferencias solo fueron significativas para el LncRNA 5. También, se ha sugerido que algunas características radiológicas como los altos valores de perfusión, la necrosis y la captación de gadolinio en la RM pueden tener valor pronóstico independiente en pacientes con GBM (Lacroix y cols. 2001). En cuanto al grado de perfusión en la RM, hemos hallado una correlación negativa entre el grado de perfusión tumoral mayor de 6 en la RM y la supervivencia. No encontramos relación entre el tamaño tumoral y la supervivencia en nuestra muestra estudio, datos soportados por la literatura (Stummer y cols. 1998). El mayor tamaño tumoral puede deberse a un diagnóstico tardío de la enfermedad, y no precisamente a la naturaleza misma del tumor.

Por otro lado, el tipo de tratamiento que recibe el paciente también se ha considerado otro determinante de la evolución final de la enfermedad. La extirpación quirúrgica macroscópica completa del tumor ha demostrado prolongar la supervivencia de los pacientes con GBM en la mayoría de los estudios y en una revisión sistemática (Stummer y cols. 1998, Sanai y cols. 2008). En nuestro trabajo, los pacientes en los que se realizó una extirpación completa de la lesión presentaron una mayor supervivencia que aquellos con una extirpación subtotal, lo que nos indica que la resección amplia es un factor protector (HR 0,45,  $p= 0,0001$ ). Así mismo, tanto la radioterapia focal como la quimioterapia han demostrado prolongar la supervivencia de los pacientes con GBM (Walker y cols. 1978 y 1980, Stupp y cols. 2005), algo también observado en nuestro entorno y en el seguimiento de nuestra cohorte (Samprón 2017).

En nuestro trabajo, hemos encontrado que, la localización del tumor en hemisferio derecho, en área elocuente o de manera bilateral en ambos hemisferios, pueden afectar la supervivencia. En relación con la localización anatómica del tumor, Chaichana y colaboradores sugieren que los tumores que contactan con los ventrículos cerebrales muestran un peor pronóstico (Chaichana y cols. 2008). Gorlia y colaboradores, por el contrario, encontraron que ninguna localización cerebral en particular influenciaba el

pronóstico, aunque en ese estudio los pacientes con tumores multifocales o multicéntricos mostraron un pronóstico desfavorable en relación con los unifocales (Gorlia y cols. 2008). A diferencia de estos últimos, nuestros resultados indican que ciertas localizaciones pueden influenciar en el pronóstico, las localizaciones bilaterales o en áreas elocuentes limitan considerablemente el grado de extirpación quirúrgica y el área de irradiación. Respecto a esto, Duffau y cols. se ha referido previamente en múltiples estudios (Duffau y cols 2005).

#### IDENTIFICACIÓN DE UN PATRÓN DE LncRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADO EN GLIOMAS

Los LncRNAs guían procesos durante el desarrollo y su alteración se ha visto asociada en múltiples patologías humanas. Recientemente, los LncRNAs han tomado relevancia en la progresión tumoral y en concreto en la gliomagenesis, ya que se han visto diferencialmente expresados en biopsias de los distintos grados de glioma al compararse con el tejido cerebral sano, e involucrados en el desarrollo y progresión del GBM. De todas formas, todavía es poco lo que se sabe sobre cómo los LncRNAs regulan el desarrollo de los gliomas.

En un esfuerzo por ampliar el conocimiento de los mecanismos epigenéticos involucrados en la progresión del glioma y la patobiología del GBM, y definir, el impacto de los LncRNAs en la gliomagénesis, en este estudio hemos analizado la relación existente entre un patrón de LncRNAs y este tipo de cáncer. En nuestro trabajo, realizado en una cohorte de 43 pacientes del Hospital Donostia de San Sebastián, se demuestra que este patrón de LncRNAs (en concreto los LncRNAs 1, 5 y 10) se encuentra diferencialmente expresado entre los distintos grados de glioma, disminuyendo su expresión a medida que avanza el estadio tumoral, siendo sus niveles los más bajos (aunque variables) en el GBM. Estos resultados son coherentes con un trabajo anterior, donde este patrón de LncRNAs estaba disminuido en el cáncer colorrectal, aunque los cambios sólo alcanzaron significación estadística ( $P < 0,01$ ) para 7 de 12 LncRNAs (Sánchez y cols. 2014). De manera sorprendente los niveles de los LncRNAs estaban sobre-expresados en los gliomas, tanto en los de bajo como en los de alto grado, al compararse con el tejido cerebral sano y peritumoral. Además, encontramos algunos transcritores sin asignar (Unassigned), que en algunos casos habían sido anotado en estudios anteriores como LncRNAs y que se han utilizado como

controles (Sánchez y cols. 2014). Este incremento es debido probablemente a que (i) el número de muestras controles es muy reducido, (ii) las muestras provienen de regiones peri-tumorales con lo que los niveles pueden estar ya alterados y (iii) no se compara tejido sano y tumoral del mismo paciente.

Es importante destacar que hemos observado que el subconjunto de biopsias de GBM que presentan niveles menores de LncRNAs 1, 5 y 10 está asociado con el subgrupo de pacientes con menor supervivencia global. De hecho, la supervivencia de los pacientes disminuyó de mediana 3 meses en los pacientes con biopsias con niveles bajos, aunque no fue estadísticamente significativo. Es probable que la no presencia de resultados significativos se deba a que la cohorte de estudio es pequeña. En el estudio anterior en cáncer de colon, las muestras que exhiben niveles disminuidos de este patrón de LncRNAs se asociaron a un mal pronóstico clínico demostrando que estos LncRNAs constituyen un patrón supresor de tumores (Sánchez y cols. 2014). La expresión y la relevancia clínica del patrón de LncRNAs son consistentes con estudios previos en donde se estudiaron los LncRNAs en los gliomas. De hecho, pocos trabajos han informado de un papel positivo de LncRNAs en los gliomas (Blake 2012, Xiaoyong 2014, Jun 2016, Ping 2015, Hongsheng 2016). Por el contrario, el papel y la expresión de los LncRNAs en el cáncer se correlacionan principalmente con la carcinogénesis. Se ha publicado que los bajos niveles de expresión de los LncRNAs pueden estar relacionados con la onco-génesis en cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, próstata, pulmón y GBM (Sánchez 2014, Gupta 2010, Yuan 2014, Xiaochun 2016, Yilong 2015). Con base en los resultados anteriores (Sánchez y cols. 2014), hemos decidido utilizar un LncRNA sin asignar (unassigned 4) como un control y hemos demostrado que no se expresó diferencialmente en comparación con el tejido sano.

#### ASOCIACIÓN DEL PATRÓN DE LncRNAs CON PARAMETROS CLÍNICOS

A continuación, estudiamos la relación entre la expresión de los LncRNAs con el pronóstico del GBM y otros biomarcadores previamente descritos en esta enfermedad y estudiados en la cohorte de pacientes del Hospital Donostia. En este estudio, hemos visto que, las localizaciones frontal y temporal se han asociado principalmente con la disminución de los LncRNA 5 y 10, aunque probablemente estas diferencias se deban a que estas dos localizaciones fueron las más frecuentes. Previamente Lamborn y colaboradores (2004) encontraron que la localización frontal se asociaba con un pronóstico más

favorable. Sin embargo, en nuestro estudio, este hallazgo no tuvo ningún impacto relevante en la supervivencia. En relación con la localización anatómica del tumor, Chaichana y colaboradores sugirieron que los tumores que contactan con los ventrículos cerebrales muestran un peor pronóstico (Chaichana y cols. 2008). Sin embargo, no hemos encontrado ninguna relación entre el contacto del tumor con el ventrículo con ninguno de los LncRNAs de estudio ni con el pronóstico. Tampoco hemos visto alguna relación entre el tamaño del tumor y la expresión de los LncRNAs en nuestro estudio.

La presencia, ausencia o modificación de determinadas proteínas y actividad génica en las células tumorales pueden indicar un comportamiento clínico diferente (Simmons 2001, Wrensch y cols. 2002). Como se ha indicado en la introducción, determinados factores moleculares y genéticos han mostrado valor pronóstico en el GBM y en gliomas difusos. Entre estos factores, destaca el estado de metilación (silenciamiento) del promotor del gen MGMT (gen implicado en la reparación del ADN frente al daño inducido por agentes alquilantes) que ha mostrado tener valor pronóstico independiente (Esteller y cols. 2000, Hegi y cols. 2005). En concreto, aquellos pacientes con tumores en el que el gen MGMT se encontraba silenciado fueron los que más se beneficiaron del tratamiento con TMZ (Hegi y cols. 2005). Al correlacionar los niveles de expresión de los LncRNAs con la metilación de MGMT, no hubo relación con el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, de las 43 muestras analizadas, solo teníamos analizado previamente la metilación de MGMT en 11 de las cuales 7 presentaban silenciamiento. La cuantificación del antígeno KI67, una proteína que se expresa durante la división celular, es una forma de cuantificar el porcentaje de células proliferativas del tumor. Aunque previamente se ha asociado el número elevado de células positivas al mal pronóstico del GBM (Simmons y cols. 2001, Ho y cols. 2003, Moskowitz y cols. 2006), en nuestro estudio no hemos visto asociación entre las células ki67 positivas, la supervivencia y la expresión de los LncRNAs.

El IDH se encuentra mutado en aproximadamente el 80% de astrocitomas difusos y anaplásicos, así como GBM secundarios. En estos últimos, varios equipos basados en la mutación del IDH y el estado del ATRX, combinado con otros biomarcadores clásicos, refinaron la clasificación molecular de los gliomas en adultos, proporcionando una herramienta diagnóstica y pronóstica (Cai 2016). Estos estudios apoyaron el desarrollo de una nueva

clasificación molecular basada en la alteración del IDH1 y la pérdida del ATRX, ya que las características clínicas y el pronóstico de los pacientes con astrocitomas de alto y bajo grado, no se reflejan con precisión en las clasificaciones histológicas (Cai 2016). De nuestra cohorte de estudio, la totalidad de las muestras con mutación en IDH1 y la mayoría de las que presentaban pérdida de ATRX, también mostraron niveles sobre-expresados de los LncRNA 1 y 10, alcanzando significancia estadística.

Se sabe que la inactivación del supresor tumoral p53 desempeña un papel importante en el desarrollo del cáncer. Un estudio reciente ha identificado la regulación existente entre un número de LncRNAs y miembros de la familia de p53 (Idogawa 2014). De manera paralela, un estudio previo en el que participa el equipo investigador de este trabajo, ha observado que existe un patrón de LncRNAs que se expresan diferencialmente al presentarse un daño en el ADN de las células de cáncer colorrectal en respuesta a p53 activo (Sánchez y cols. 2014). Además, se ha visto que este conjunto de LncRNAs contribuye a las funciones pro-apoptóticas y reguladoras del ciclo celular del p53. En consonancia con esta evidencia, los niveles de expresión de los LncRNAs regulados por p53 (Incluyendo los números 1, 5 y 10 descritos en esta Tesis) están disminuidos en muestras de cáncer colorrectal en comparación con el tejido sano adyacente de control, lo que puede constituir un patrón supresor de este tipo de cáncer (Sánchez y cols. 2014). Por el contrario, en nuestro estudio en GBM se encontró que la mayoría de las muestras que muestran disminución de los LncRNAs exhibieron una mutación del P53, aunque sin alcanzar significación estadística. Sin embargo, este resultado podría sugerir que, en los gliomas con menores niveles de los LncRNAs, también existe una actividad disminuida de P53. Por esto, creemos que, la expresión de estos LncRNA podría estar relacionada con la regulación de la actividad proliferativa de las células de glioma y que este mecanismo podría estar asociado con el p53.

#### VALIDACIÓN FUNCIONAL DE LOS LncRNAs 1 y 10

Para estudiar el impacto funcional que tiene el silenciamiento de este patrón de LncRNAs en células de glioma, se cultivaron las células de glioma U87MG con ASOs (inhibidores) de LncRNA1 y 10 respectivamente. Nuestros resultados demostraron que la capacidad proliferativa, medida por inmunofluorescencia del marcador de mitosis P-H3, estaba

significativamente aumentada en las células con 2 ASOs independientes del LncRNA 1 y 10 respectivamente.

Como hemos indicado anteriormente, parece que, a mayor grado de malignidad en los gliomas, los niveles de los LncRNAs, disminuyen, siendo los menores en los GBM. Es posible, que, con esta disminución, se silencien mecanismos reguladores de la oncogénesis. Dentro de la elevada heterogeneidad celular característica que presentan los gliomas, se ha hallado una subpoblación celular de células tumorales con características de célula madre, las denominadas células madre tumorales (CMT) que son las responsables de la progresión tumoral, malignización y resistencia a las terapias. Estudios previos han identificado que la expresión de distintos miembros de la familia SOX están aumentados en la población de CMT, su actividad mantiene y regula esta población celular y niveles elevados en biopsias clínicas, correlacionan con peor supervivencia de los pacientes (Garros-Regulez 2016, Garcia 2017). En concordancia con estos estudios, los pacientes con expresión elevada de SOX9 presentaron menor supervivencia ( $P= 0,048$ ) en nuestra cohorte. Hemos estudiado la asociación de la expresión de los LncRNAs con la expresión de SOX9, además de otros miembros de la familia como SOX1 y SOX2 demostrando que existe una relación inversa entre los niveles de expresión de los LncRNAs 1, 5 y 10 con los genes SOX 1, 2 y 9. Es decir, biopsias con niveles bajos de los LncRNAs presentan niveles elevados de la familia SOX. En el trabajo de Garros-Regulez se demostró que, la elevada expresión de estos genes SOX son clave en el mantenimiento de las características de células madre tumorales en el GBM, ya que se han asociado con el estado indiferenciado de estas células, regulando su capacidad proliferativa, lo que confiere resistencia al tratamiento con TMZ (Garros-Regulez 2016). Similarmente, en otro estudio, se describió el papel del SOX1 en la regulación de la CMT en el GBM. Su sobre-expresión se correlacionó con una disminución en la supervivencia global (Garcia y cols. 2017). Por lo tanto, esta correlación negativa demostrada en este trabajo, entre los niveles de expresión de los LncRNAs y los factores de transcripción SOX, apoya lo descrito previamente en la literatura en relación al papel de los genes SOX en la actividad de las CMT y sugiere que la expresión de los LncRNAs podría estar relacionada con la actividad de las CMTs. Para estudiar esta hipótesis hemos realizado ensayos funcionales de formación de oncosferas en la línea celular U87MG en presencia de los ASOs de los LncRNAs observando que el número de oncosferas era significativamente

mayor en las células cultivadas en presencia de los inhibidores de los LncRNAs que en las células control.

STAT3 es un regulador transcripcional muy importante que ha sido implicado en la progresión de la mayoría de cánceres conocidos (Bromberg 2002). En el caso concreto del GBM, STAT3 presenta una elevada expresión respecto al tejido cerebral sano y su inhibición resulta en la inducción de apoptosis, así como en una disminución de la proliferación tumoral (Rahaman y cols. 2002), y que, además esa elevada activación de STAT3 se correlaciona con un peor pronóstico (Birner y cols. 2010). El STAT3 es importante para la proliferación, el mantenimiento y la supervivencia de las células de GBM. Recientemente, Paula Aldaz, investigadora de nuestro centro de investigación, ha demostrado que su silenciamiento, tanto genético como farmacológico tiene los mismos efectos que el silenciamiento de SOX9. En nuestro trabajo, se ha demostrado una correlación negativa entre LncRNAs y SOX9. Como se mencionó previamente, estos niveles elevados de SOX9 se han identificado en estudios previos con peor pronóstico de los pacientes con GBM. Similarmente, las muestras tisulares de GBM analizadas en este estudio que mostraron niveles sobre-expresados de STAT 3, también, presentaron sobre-expresión en los niveles de los LncRNAs 5 y 10, alcanzando significación estadística ( $P= 0,03$ ). Adicionalmente, se ha descrito recientemente que junto a los elevados niveles de expresión de STAT3, la sobre-expresión de PML también podría ser un mediador de la actividad de SOX9 en las CMT, conformando así una vía de señalización reguladora de estas CMT (Paula Aldaz). Sin embargo, en nuestro estudio, al analizar la correlación de los LncRNAs, no vimos que se alcanzara significación estadística en relación entre los LncRNAs y el PML, ni tampoco que este último afectara la supervivencia de manera independiente.

En la última década, se ha resaltado el papel de la epigenética en la progresión de múltiples tipos de cáncer y se ha identificado la expresión de los LncRNAs como una diana molecular para el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo los gliomas (Sun Y 2013, Chen L 2015, Yan 2017). Por consiguiente, se requiere el desarrollo de más trabajos enfocados en el papel de los LncRNAs en la patogénesis de los gliomas, ya que puede representar un objetivo terapéutico útil para el tratamiento del GBM. Estudios recientes de secuenciación, están proporcionando nuevas herramientas para identificar funcionalmente las enfermedades asociadas a los LncRNAs, lo que

facilitará la identificación de estos nuevos transcriptores para la terapia del cáncer (Huarte 2015, Zheng L.L 2016). Nuestro trabajo ha demostrado que algunos LncRNAs se expresan diferencialmente en el GBM, cuando se compara con el tejido cerebral normal y con tejido de glioma de bajo grado, y que, los bajos niveles se correlacionan con la disminución de la supervivencia global del paciente, aunque no de manera significativa. En general, estos resultados subrayan el impacto que estos LncRNAs podrían tener como marcador diagnóstico en el GBM. Además, mediante ensayos funcionales hemos revelado el importante papel que desarrollan estos LncRNAs en relevantes procesos fisiopatológicos como la proliferación celular y la auto-renovación lo que confirma este patrón de LncRNAs como posibles dianas terapéuticas en este tipo de cáncer.

# ***CONCLUSIONES***



1. La expresión de los LncRNAs 1, 5 y 10 disminuye con el grado de malignidad en los gliomas, siendo sus niveles menores en los gliomas de grado IV (GBM).
2. Los niveles bajos de los LncRNAs se correlacionan con la disminución de la supervivencia del paciente en el subgrupo de pacientes con GBM.
3. El silenciamiento de los LncRNAs promueve la actividad proliferativa de las células de glioma.
4. Existe una correlación negativa entre los niveles de expresión de los LncRNAs con los genes SOX 1, 2 y 9.
5. La inhibición de los LncRNAs incrementa de manera significativa la auto-renovación, lo que sugiere que este patrón de LncRNAs modula la función de las células madre de glioma.
6. El patrón de LncRNAs identificado en este estudio tiene potencial como biomarcador para el diagnóstico del GBM y son potenciales dianas terapéuticas.



# ***BIBLIOGRAFÍA***



Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Fourth ed. New York: Garland Science.

Amaral, P., Clark, M.B., Gascoigne, D.K., Dinger, M.E., Mattick, J.S. (2010). LncRNADB: A reference database for long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research* 39 (Database issue):D146–D151.

Balasubramaniam, A., Shannon, P., Hodaie, M., Laperriere, N., Michaels, H., Guha, A. (2007). Glioblastoma multiforme after stereotactic radiotherapy for acoustic neuroma: case report and review of the literature. *Neuro Oncol* 9(4):447-453.

Bampoe, J., Ritvo, P., Bernstein, M. (1998). Quality of life in patients with brain tumor: what's relevant in our quest for therapeutic efficacy. *Neurosurg Focus* 4(6):e6.

Bampoe, J., Laperriere, N., Pintilie, M., Glen, J., Micallef, J., Bernstein, M. (2000). Quality of life in patients with glioblastoma multiforme participating in a randomized study of brachytherapy as a boost treatment. *J Neurosurg* 93(6):917-926.

Bao, S., et al. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-60.

Barker, FG., Prados, MD., Chang, SM., Gutin, PH., Lamborn, KR., Larson, DA., et al. (1996). Radiation response and survival time in patients with glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 84(3):442-448.

Barsyte-Lovejoy, D., Lau, SK., Boutros, PC., Khosravi F., Jurisica, I., Andrulis, IL., Tsao, MS., Penn, LZ. (2006). The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res* 66(10):5330-7.

Belliveau, JW., Kennedy, DN., McKinstry, RC., Buchbinder, BR., Weisskoff, RM., Cohen, MS., et al. (1991). Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. *Science* 254(5032):716-719.

Belter, A., Rolle, K., Piwecka, M., Fedoruk-Wyszomirska, A., Naskret-Barciszewska, M. Z., and Barciszewski, J. (2016). Inhibition of miR-21 in glioma cells using catalytic nucleic acids. *Sci. Rep.* 6:24516.

Bian, E. B., Li, J., Xie, Y. S., Zong, G., Li, J., and Zhao, B. (2015). LncRNAs: new players in gliomas, with special emphasis on the interaction of lncRNAs With EZH2. *J. Cell. Physiol.* 230:496–503.

Birlik, B., Canda, S., Ozer, E. (2006). Tumour vascularity is of prognostic significance in adult, but not paediatric astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32(5):532-538.

Birney, E., Stamatoyannopoulos, JA., Dutta, A., et al. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447 (7146): 799–816.

Blake C. Ellis, Peter L. Molloy and Lloyd D. Graham. (2012). CRNDE: a long non-coding RNA involved in Cancer, Neurobiology, and Development. *Frontiers in genetics* 3:270.

Braidotti, G., Baubec, T., Pauler, F., et al. (2004). "The Air noncoding RNA: an imprinted cis-silencing transcript". *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 69:55–66.

Brosius, J. (2005). Waste not, want not--transcript excess in multicellular eukaryotes. *Trends in Genetics* 21 (5):287–8.

Bonavia, R., Inda, M.D.M., Cavenee, W.K., and Furnari, F.B. (2011). Heterogeneity maintenance in glioblastoma: A social network. *Cancer Res.* 71, 4055–4060.

Bondy, M., Wiencke, J., Wrensch, M., Kyritsis, AP. (1994). Genetics of primary brain tumors: a review. *J Neurooncol* 18(1):69-81.

Bondy, ML., Wang, LE., El Zein, R., de Andrade, M., Selvan, MS., Bruner, JM., et al. (2001). Gamma-radiation sensitivity and risk of glioma. *J Natl Cancer Inst* 93(20):1553-1557.

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155: 462–477.

Broadbent, HM., Peden, JF., Lorkowski, S., et al. (2008). Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Human Molecular Genetics* 17 (6):806–14.

Bucy, PC., Oberhill, HR., Siqueira, EB., Zimmerman, HM., Jelsma, RK. (1985). Cerebral glioblastomas can be cured! *Neurosurgery* 16(5):714-717.

Burrell, R., McGranahan, N., Bartek, J., and Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 501:338–345.

Cai, H., Xue, Y, Wang, P., Wang, Z., Li, Z., Hu, Y., Li Z., Shang X., Liu Y. (2015). The long noncoding RNA TUG1 regulates blood-tumor barrier permeability by targeting miR-144. *Oncotarget*. 6(23):19759-79.

Cai, J., Zhang, C., Zhang, W., et al. (2016). ATRX, IDH1-R132H and Ki-67 immunohistochemistry as a classification scheme for astrocytic tumors. *Oncoscience*, 3(7-8):258–265.

Cairncross, JG., Ueki, K., Zlatescu, MC., Lisle, DK., Finkelstein, DM., Hammond, RR., et al. (1998). Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90(19):1473-1479.

Calin, GA., Liu, CG., Ferracin, M., et al. (2007). Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell* 12(3):215–29.

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., et al. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309(5740):1559–63.

Carrasco-Garcia, E., et al. (2013). Therapeutic strategies targeting

glioblastoma stem cells. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 8:216-27.

Castillo, S.D., and Sanchez-Cespedes, M. (2012). The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16:903–919.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J.L., Nuñez, G., et al. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10:105–115.

CBTRUS. Statistical Report: Primary Brains Tumors in the United States, 1998-2002. 2005. Central Brain Tumors Registry of the United States.

Cai, B., Song, X. Q., Cai, J. P., and Zhang, S. (2014). HOTAIR: a cancer-related long non-coding RNA. *Neoplasma* 61:379–391.

Chaichana, KL., McGirt, MJ., Frazier, J., Attenello, F., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, A.. (2008). Relationship of glioblastoma multiforme to the lateral ventricles predicts survival following tumor resection. *J Neurooncol.*

Chakravadhanula, M., Ozols, VV., Hampton, CN., Zhou, L., Catchpoole, D., Bhardwaj, RD. (2014). Expression of the HOX genes and HOTAIR in atypical teratoid rhabdoid tumors and other pediatric brain tumors. *Cancer Genet.* 207(9):425-8.

Chen, L., Han, L., Wei, J., Zhang, K., Shi, Z., Duan, R., Li, S., Zhou, X., Pu, P., Zhang, J., Kang, C. (2015). SNORD76, a box C/D snoRNA, acts as a tumor suppressor in glioblastoma. *Sci Rep.* 5:85-88.

Chen, T., Yang, P., and He, Z. Y. (2016). Long noncoding RNA H19 can predict a poor prognosis and lymph node metastasis: a meta-analysis in human cancer. *Minerva Med.* 107:251–258.

Chen, Y., et al. (2015). Differential LncRNA expression profiles in recurrent gliomas compared with primary gliomas identified by microarray analysis. *Int*

J Clin Exp Med. 8(4):5033-43.

Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J.K., Fang, X., Sloan, A.E., Mao, Y., Lathia, J.D., et al. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153, 139–152.

Cloughesy, TF., Yoshimoto, K., Nghiemphu, P., Brown, K., Dang, J., Zhu, S., et al. (2008). Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med* 5(1):e8.

DeAngelis, LM. (2001). Brain Tumors. *N Engl J Med* 344(2):114-123.

DeAngelis, LM. (2005). Chemotherapy for Brain Tumors - A New Beginning. *N Engl J Med* 352(10):1036-1038.

Dehdashti, AR., Sharma, S., Laperriere, N., Bernstein, M. (2007). Coincidence vs cause: cure in three glioblastoma patients treated with brachytherapy. *Can J Neurol Sci* 34(3):339-342.

Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., et al (2012). "The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression". *Genome Research* 22(9):1775–1789.

Dong, H., Luo, L., Hong, S., et al. (2010). Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. *BMC Syst Biol* 4:163.

Earnest, F., Kelly, PJ., Scheithauer, BW., Kall, BA., Cascino, TL., Ehman, RL., et al. (1998). Cerebral astrocytomas: histopathologic correlation of MR and CT contrast enhancement with stereotactic biopsy. *Radiology* 166(3):823-827.

Efeyan, A., Serrano, M. (2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 6(9):1006-1010.

Eis, PS., Tam, W., Sun, L., et al. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas". *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 102(10):3627–32.

Elxpuru-Camiruaga, J., Buxton, N., Kandula, V., Dias, PS., Campbell, D., McIntosh, J., et al. (1995). Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. *Cancer Res* 55(19):4237- 4239.

Ellis, BC., Molloy, PL., Graham, LD. (2012). CRNDE: A Long Non-Coding RNA Involved in Cancer, Neurobiology, and Development. *Front Genet.* 3:270.

Enciso-Mora, V., Hosking, FJ., Kinnersley, B., Wang, Y., Shete, S., Zelenika, D., Broderick, P., Idbaih, A., et al. (2013). Deciphering the 8q24.21 association for glioma. *Hum Mol Genet.* 22(11):2293-302.

Engström, PG., Tommei, D., Stricker, SH., Ender, C., Pollard, SM., Bertone, P. (2012). Digital transcriptome profiling of normal and glioblastoma-derived neural stem cells identifies genes associated with patient survival. *Genome Med.* 4(10):76.

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, SN., Hidalgo, OF., Vanaclocha, V., et al. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343(19):1350-1354.

Feng, J., Bi, C., Clark, BS., Mady, R., Shah, P., Kohtz, JD. (2006). The Efv-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes & Development* 20(11):1470–84.

Fetell, MR., Grossman, SA., Fisher, JD., Erlanger, B., Rowinsky, E., Stockel, J., et al. (1997). Preirradiation paclitaxel in glioblastoma multiforme: efficacy, pharmacology, and drug interactions. *New Approaches to Brain Tumor Therapy Central Nervous System Consortium.* *J Clin Oncol* 15(9):3121-3128.

Folstein, MF., Folstein, SE., McHugh, PR. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12(3):189-198.

Foulkes, WD. (2007). p53--master and commander. *N Engl J Med* 357(25):2539-2541.

Fu, X., Ravindranath, L., Tran, N., Petrovics, G., Srivastava, S. (2006). Regulation of apoptosis by a prostate-specific and prostate cancer-associated noncoding gene, PCGEM1. *DNA and Cell Biology* 25(3):135–41.

Furnari, FB., Fenton, T., Bachoo, RM., Mukasa, A., Stommel, JM., Stegh, A., et al. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21(21):2683-2710.

Galasso, M., Dama, P., Previati, M., Sandhu, S., Palatini, J., Coppola, V., Warner, S., Sana, ME., et al. (2014). A large scale expression study associates uc.283-plus lncRNA with pluripotent stem cells and human glioma. *Genome Med.* 6(10):76.

Garbizu, JM., Mateo-Sierra, O., Perez-Calvo, JM., Iza, B., Ruiz-Juretschke, F. (2008). Radiation-induced cranial tumors: clinical series and literature review. *Neurocirugia (Astur)* 19(4):332-337.

Garcia, I., Aldaregia, J., Marjanovic, J., et al. (2017). Oncogenic activity of SOX1 in glioblastoma. *Sci Rep* 7:46575.

Garcia-Claver, A., Lorente, M., Mur, P., Campos-Martin, Y., Mollejo, M., Velasco, G., et al. (2013). Gene expression changes associated with erlotinib response in glioma cell lines. *Eur. J. Cancer* 49, 1641–1653.

Garros-Regulez L, et al (2016). mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolamide resistance. *Expert Opin Ther Targets* 20:393-405.

Garros-Regulez L, et al (2016). Targeting Sox 2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma. *Front Oncol* 24(6):222.

Geissler, E., Staneczek, W. (1998). SV40 and human brain tumors. *Arch Geschwulstforsch* 58(2):129-134.

Goodrich, JA., Kugel, JF. (2006). Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (8): 612–6.

Gorlia, T., van den Bent, MJ., Hegi, ME., Mirimanoff, RO., Weller, M., Cairncross, JG., et al. (2008). Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol* 9(1):29-38.

Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313.

Grossman, SA., Batarra, JF. (2004). Current management of glioblastoma multiforme. *Semin Oncol* 31(5):635-644.

Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P.N., and Lovell-badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245–250.

Guo, H., Wu, L., Yang, Q., Ye, M., Zhu, X. (2015). Functional linc-POU3F3 is overexpressed and contributes to tumorigenesis in glioma. *Gene*. 554(1):114-9.

Gupta, R., et al. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 464:1071–1076.

Hahn, WC., Weinberg, RA. (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347(20):1593-1603.

Han, L., et al. (2012). LncRNA profile of glioblastoma reveals the potential role of lncRNAs in contributing to glioblastoma pathogenesis. *Int J Oncol*. 40(6):2004-12.

Han, Y., Wu, Z., Wu, T., Huang, Y., et al. (2016a). Tumor-suppressive function of long noncoding RNA MALAT1 in glioma cells by downregulation of MMP2 and inactivation of ERK/MAPK signaling. *Cell Death Dis.* 7, e2123.

Han, Y., Zhou, L., Wu, T., Huang, Y., Cheng, Z., Li, X., et al. (2016b). Downregulation of lncRNA-MALAT1 affects proliferation and the expression of stemness markers in glioma stem cell line SHG139S. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36:1097–1107.

Hanahan, D., Weinberg, RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674.

He, C., Jiang, B., Ma, J., and Li, Q. (2016). Aberrant NEAT1 expression is associated with clinical outcome in high grade glioma patients. *APMIS* 124:169–174.

Hegi, ME., Diserens, AC., Gorlia, T., Hamou, MF., de Tribolet, N., Weller, M., et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):997-1003.

Hesman Saey, Tina. (2011). Missing Lincs. *Science News* 18(13):22–25.

Ho, DM., Hsu, CY., Ting, LT., Chiang, H. (2003). MIB-1 and DNA topoisomerase II alpha could be helpful for predicting long-term survival of patients with glioblastoma. *Am J Clin Pathol* 119(5):715- 722.

Hodges, LC., Smith, JL., Garrett, A., Tate, S. (1992). Prevalence of glioblastoma multiforme in subjects with prior therapeutic radiation. *J Neurosci Nurs* 24(2):79-83.

Hongsheng Y., Jie Z., Shugang X. (2016). MDC1-AS, an antisense long noncoding RNA, regulates cell proliferation of glioma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 81:203– 209.

Hoption Cann, SA., Van Netten, JP., Van Netten, C. (2006). Acute infections as a means of cancer prevention: opposing effects to chronic infections? *Cancer Detect Prev* 30(1):83-93.

Hou, LC., Veeravagu, A., Hsu, AR., Tse, VCK. (2006). Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurgical FOCUS* 20(4):E3.

Hu, L., et al. (2016). Up-Regulation of Long Non-Coding RNA AB073614 Predicts a Poor Prognosis in Patients with Glioma. *Int J Environ Res Public Health*. 13(4).

Hu, W., et al. (2015). Tumor heterogeneity uncovered by dynamic expression of long noncoding RNA at single-cell resolution. *Cancer Genet*. 208(12):581-6.

Hubackova, S., Krejčíková, K., Bartek, J., and Hodny, Z. (2012). Interleukin 6 signaling regulates promyelocytic leukemia protein gene expression in human normal and cancer cells. *J. Biol. Chem.* 287:26702–26714.

Idogawa, M., et al. (2014). Identification and analysis of large intergenic non-coding RNAs regulated by p53 family members through a genome-wide analysis of p53-binding sites. *Hum. Mol. Genet*. 23:2847–2857.

Ishii, N., Ozaki, K., Sato H, et al. (2006). "Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction". *Journal of Human Genetics* 51(12):1087–99.

Ito, K., Bernardi, R., Morotti, A., Matsuoka, S., Ikeda, Y., Rosenblatt, J., Avigan, D.E., Teruyafeldstein, J., and Pandolfi, P.P. (2008). PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *453*:1072–1078.

Jiang, X., et al. (2016). Increased level of H19 long noncoding RNA promotes invasion, angiogenesis, and stemness of glioblastoma cells. *J Neurosurg*. 124(1):129-36.

Jun Li., et al. (2016). LncRNA TUG1 acts as a tumor suppressor in human glioma by promoting cell apoptosis. *Experimental Biology and Medicine* 241:644–649.

Junttila, MR., de Sauvage, FJ. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501(7467):346-354.

Kahlert, U. D., Nikkhah, G., and Maciaczyk, J. (2013). Epithelial-to-mesenchymal (-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett.* 331, 131–138.

Kan, P., Simonsen, SE., Lyon, JL., Kestle, JR. (2008). Cellular phone use and brain tumor: a meta-analysis. *J Neurooncol* 86(1):71-78.

Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., et al. (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 316(5830):1484–8.

Kapranov, P., Willingham, AT., Gingeras, TR. (2007). Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nature Reviews. Genetics* 8(6):413–23.

Katsushima, K., Kondo, Y. (2014). Non-coding RNAs as epigenetic regulator of glioma stem-like cell differentiation. *Front Genet.* 5:14.

Ke, J., et al. (2015). Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits malignant biological behaviors of human glioma cells via modulation of miR-326. *Oncotarget.* 6(26):21934-49.

Keles, GE., Anderson, B., Berger, MS. (1999). The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. *Surg Neurol* 52(4):371-379.

Keles, GE., Berger, MS. (2004). Advances in neurosurgical technique in the current management of brain tumors. *Semin Oncol* 31(5):659-665.

Keles, GE., Lamborn, KR., Chang, SM., Prados, MD., Berger, MS. (2004). Volume of residual disease as a predictor of outcome in adult patients with recurrent supratentorial glioblastomas multiforme who are undergoing chemotherapy. *J Neurosurg* 100:41-46.

Keles, GE., Chang, EF., Lamborn, KR., Tihan, T., Chang, CJ., Chang, SM., et al. (2006). Volumetric extent of resection and residual contrast enhancement on initial surgery as predictors of outcome in adult patients with hemispheric anaplastic astrocytoma. *J Neurosurg* 105(1):34-40.

Kiang, KM., Zhang, XQ., Leung, GK. (2015). Long Non-Coding RNAs: The Key Players in Glioma Pathogenesis. *Cancers (Basel)*. 7(3):1406-24.

Kiefer, JC (2007). Epigenetics in development. *Developmental Dynamics* 236 (4):1144–56.

Kraus, TF., et al. (2015). Identification of Stably Expressed lncRNAs as Valid Endogenous Controls for Profiling of Human Glioma. *J Cancer*. 6(2):111-9.

Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., et al. (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130(Pt 10):2596-2606.

Lacroix, M., Abi-Said, D., Fournay, DR., Gokaslan, ZL., Shi, W., DeMonte, F., et al. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95(2):190-198.

LeBlanc, VC., Morin, P. (2015). Exploring miRNA-Associated Signatures with Diagnostic Relevance in Glioblastoma Multiforme and Breast Cancer Patients. *J Clin Med*. 4(8):1612-30.

Leon, SP., Folkerth, RD., Black, PM. (1996). Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* 77(2):362-372.

Lengauer, C., Kinzler, KW., Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396(6712):643-649.

Li, J., et al. (2016) Epigenetic repression of long non-coding RNA MEG3 mediated by DNMT1 represses the p53 pathway in gliomas. *Int J Oncol* 48(2):723-33.

Li, J., Witte, DP., Van Dyke, T., Askew, DS. (1997). Expression of the putative proto-oncogene His-1 in normal and neoplastic tissues. *The American Journal of Pathology* 150 (4):1297–305.

Li, J., et al. (2016). lncRNA TUG1 acts as a tumor suppressor in human glioma by promoting cell apoptosis. *Exp Biol Med (Maywood)* 241(6):644-9.

Li, R., Qian, J., Wang, YY., Zhang, JX., You, YP. (2014). Long noncoding RNA profiles reveal three molecular subtypes in glioma. *CNS Neurosci Ther* 20(4):339-43.

Li, W., et al. (2016). Suppressing H19 Modulates Tumorigenicity and Stemness in U251 and U87MG Glioma Cells. *Cell Mol Neurobiol* 36(8):1219-1227.

Liu, A., Yu, X., and Liu, S. (2013). Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: Small genes make a big difference. *Chin. J. Cancer* 32, 483–487.

Liu, H., Lv, Z., and Guo, E. (2015). Knockdown of long noncoding RNA SPRY4-IT1 suppresses glioma cell proliferation, metastasis and epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8:9140–9146.

Liu, Q., Sun, S., Yu, W., Jiang, J., Zhuo, F., Qiu, G., Xu, S., Jiang, X. (2015). Altered expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced cell death in human glioma cells. *J Neurooncol* 122(2):283-92.

Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., Martin-Trevino, R., Shang, L., McDermott, S.P., Landis, M.D., et al. (2014). Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports* 2, 78–91.

Loeb, LA. (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61(8):3230-3239.

Loeffler, JS., Niemierko, A., Chapman, PH. (2003). Second tumors after radiosurgery: tip of the iceberg or a bump in the road? *Neurosurgery* 52(6):1436-1440.

Louis, DN., Ohgaki, H., Wiestler, OD., Cavenee, WK., Burger, PC., Jouvet, A., et al. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC press.

Lukiw, WJ., Handley, P., Wong, L., Crapper McLachlan, DR. (1992). BC200 RNA in normal human neocortex, non-Alzheimer dementia (NAD), and senile dementia of the Alzheimer type (AD). *Neurochem Res* 17(6):591–7.

Lyons, J.G., Lobo, E., Martorana, A.M., and Myerscough, M.R. (2008). Clonal diversity in carcinomas: Its implications for tumour progression and the contribution made to it by epithelial- mesenchymal transitions. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 665–677.

Ma, J., et al (2016). Knockdown of long non-coding RNA MALAT1 increases the blood-tumor barrier permeability by up-regulating miR-140. *Biochim Biophys Acta* 1859(2):324-38.

Ma, KX., et al. (2015). Long noncoding RNA MALAT1 associates with the malignant status and poor prognosis in glioma. *Tumour Biol* 36(5):3355-9.

Marusyk, A., Almendro, V., and Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* 12: 323–334.

McKinley, BP., Michalek, AM., Fenstermaker, RA., Plunkett, RJ. (2000). The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *J Neurosurg* 93(6):932-939.

McPherson, R., Pertsemlidis, A., Kavaslar, N., et al. (2007). A Common Allele on Chromosome 9 Associated with Coronary Heart Disease. *Science* 316(5830):1488–91.

Mercer, TR., Dinger, ME., and Mattick, JS. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 3:155-159.

Mochizuki, S., Iwadate, Y., Namba, H., Yoshida, Y., Yamaura, A., Sakiyama, S., et al. (1999). Homozygous deletion of the p16/MTS-1/CDKN2 gene in malignant gliomas is infrequent among Japanese patients. *Int J Oncol* 15(5):983-989.

Monticone, M., Daga, A., Candiani, S., et al. (2012). Identification of a novel set of genes reflecting different in vivo invasive patterns of human GBM cells. *BMC Cancer* 17(12):358.

Morokoff, A., Ng, W., Gogos, A., and Kaye, A. (2015). Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J. Clin. Neurosci.* 22:1219–1226.

Moskowitz, Sl., Jin, T., Prayson, RA. (2006). Role of MIB1 in predicting survival in patients with glioblastomas. *J Neurooncol* 76(2):193-200.

Nickerson, JA., Krochmalnic, G., Wan, KM., Penman, S. (1989). Chromatin architecture and nuclear RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(1):177–81.

Nieder, C., Astner, ST., Mehta, MP., Grosu, AL., Molls, M. (2008). Improvement, clinical course, and quality of life after palliative radiotherapy for recurrent glioblastoma. *Am J Clin Oncol* 31(3):300-305.

Nowell, PC. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194(4260):23-28.

Nunes, MC., Roy, NS., Keyoung, HM., et al. (2003). Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 9(4):439-447.

Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, PL., et al. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64(19):6892-6899.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 19, 764–772.

Ostrom, QT., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, NE., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, JS. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 15 Suppl 2:ii1–i56.

Pal, A., Srivastava, T., Sharma, MK., et al. (2010). Aberrant methylation and associated transcriptional mobilization of Alu elements contributes to genomic instability in hypoxia. *J Cell Mol Med* 14(11):2646-54.

Pang, JC., Li, KK., Lau, KM., et al. (2010). KIAA0495/PDAM is frequently downregulated in oligodendroglial tumors and its knockdown by siRNA induces cisplatin resistance in glioma cells. *Brain Pathol.* 20(6):1021-32.

Pang, KC., Frith, MC., Mattick, JS. (2006). Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends in Genetics* 22(1):1–5.

Panganiban, G., Rubenstein, JL. (2002). Developmental functions of the *Distal-less/Dlx* homeobox genes. *Development* 129(19):4371–86.

Park, JY., et al. (2014). Roles of Long Non-Coding RNAs on Tumorigenesis and Glioma Development. *Brain Tumor Res Treat* 2(1):1-6.

Pasmant, E., Laurendeau, I., Héron, D., Vidaud, M., Vidaud, D., Bièche, I. (2007). Characterization of a germ-line deletion, including the entire *INK4/ARF* locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of *ANRIL*, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with *ARF*. *Cancer Research* 67(8):3963–9.

Pauler, FM., Koerner, MV., Barlow, DP. (2007). Silencing by imprinted noncoding RNAs: is transcription the answer? . *Trends in Genetics* 23(6): 284–92.

Paulovich, AG., Toczyski, DP., Hartwell, LH. (1997). When checkpoints fail. *Cell* 88(3):315-321.

Perkel, Jeffrey M. (2013). Visiting "Noncodarnia". *BioTechniques* (paper) 54(6):301–304.

Pickard, M. R., and Williams, G. T. (2015). Molecular and cellular mechanisms of action of tumour suppressor *GAS5* lncRNA. *Genes* 6, 484–499.

Ping W., et al. (2015). Long non-coding RNA *CASC2* suppresses malignancy in human gliomas by *miR-21*. *Cellular Signalling* 27:275–282.

Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., et al. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494(3):415-434.

Qin, X., et al. (2014). lncRNA *TSLC1-AS1* is a novel tumor suppressor in glioma. *Int J Clin Exp Pathol* 15;7(6):3065-72.

Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Gonzalez-Perez, O., Garcia-Verdugo, JM. (2007). The human brain subventricular zone: stem cells in this niche and its organization. *Neurosurg Clin N Am* 18(1):15-20.

Qureshi, IA., Mehler, MF. (2013). Developing epigenetic diagnostics and therapeutics for brain disorders. *Trends Mol Med.* 19(12):732-41.

Rader, J., Russell, M. R., Hart, L. S., Nakazawa, M. S., Belcastro, L. T., Martinez, D., et al. (2013). Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 19:6173–6182.

Rahaman, S.O., Harbor, P.C., Chernova, O., Barnett, G.H., Vogelbaum, M. a, and Haque, S.J. (2002). Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 21:8404–8413.

Rao, RD., James, CD. (2004). Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Semin Oncol* 31(5):595-604.

Raz, R., Lee, C.K., Cannizzaro, L.A., d'Eustachio, P., and Levy, D.E. (1999). Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 2846–2851.

Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Larocca, L.M., Lombardi, D.G., Signore, M., Pierconti, F., Petrucci, G., Montano, N., Maira, G., and De Maria, R. (2008). Mesenchymal differentiation of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ.* 15:1491–1498.

Rinn, JL., Kertesz, M., Wang, JK., et al. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129(7):1311–23.

Samprón, N., Undabeitia, J., Torres- Bayona, S., Aldaz, P., Carrasco-Garcia, E., Arrazola, M., et al. (2017). Clinical Prognostic Factors are better Outcome Predictors than Molecular Factors in Glioblastoma. *Clin Oncol.* 2:1178.

Sanai, N., Tramontin, AD., Quinones-Hinojosa, A., et al. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks

chain migration. *Nature* 427(6976):740-744.

Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., Berger, MS. (2005). Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 353(8):811-822.

Sanai, N., Berger, MS., Garcia-Verdugo, JM., Alvarez-Buylla, A. (2007). Comment on "Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension". *Science* 318(5849):393.

Sanai, N., Berger, MS. (2008). Biology of brain tumor stem cells. *Neurosurg Focus* 24(3-4):E26.

Sánchez-Elsner, T., Gou, D., Kremmer, E., Sauer, F. (2006). Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit Drosophila Ash1 to Ultrabithorax. *Science* 311(5764):1118–23.

Sánchez, Y., Segura, V., Marín-Béjar, O., et al. (2014). Genome-wide analysis of the human p53 transcriptional network unveil a lncRNA tumour suppressor signature. *Nat Commun.* 19(5):5812.

Sawaya, R., Hammoud, M., Schoppa, D., Hess, KR., Wu, SZ., Shi, WM., et al. (1998). Neurosurgical outcomes in a modern series of 400 craniotomies for treatment of parenchymal tumors. *Neurosurgery* 42(5):1044-1055.

Schoeftner, S., Blasco, MA. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature Cell Biology* 10(2): 228–36.

Sherr, C. J., Beach, D., and Shapiro, G. I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: from discovery to therapy. *Cancer Discov.* 6:353–367.

Shi, X., Sun, M., Liu, H., Yao, Y., Kong, R., Chen, F., et al. (2015). A critical role for the long non-coding RNA GAS5 in proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer. *Mol. Carcinog.* 54(Suppl. 1), E1–E12.

Shi, Y., et al. (2015). miR-663 Suppresses Oncogenic Function of CXCR4 in Glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 21(17):4004-13.

Shi, Y., et al. (2014). Long non-coding RNA H19 promotes glioma cell invasion by deriving miR-675. *PLoS One*. 9(1):e86295.

Simmons, ML., Lamborn, KR., Takahashi, M., Chen, P., Israel, MA., Berger, MS., et al. (2001). Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res* 61(3):1122-1128.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, a M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex- determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821–5828.

Singh, S.K. et al. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396-401.

Schmitt, A. M., and Chang, H. Y. (2016). Long noncoding RNAs in cancer pathways. *Cancer Cell* 29:452–463.

Smith, JE., Alvarez-Dominguez, JR., Kline, N., et Al (2014). Translation of Small Open Reading Frames within Unannotated RNA Transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell reports* 7(6):1858–66.

Sonkoly, E., Bata-Csorgo, Z., Pivarcsi, A., et al. (2005). Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (25): 24159–67.

Soo, TM., Bernstein, M., Provias, J., Tasker, R., Lozano, A., Guha, A. (1995). Failed stereotactic biopsy in a series of 518 cases. *Stereotact Funct Neurosurg* 64(4):183-196.

Stine, R.R., and Matunis, E.L. (2013). JAK-STAT signaling in stem cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 786, 247–267.

Stummer, W., Stocker, S., Wagner, S., et al. (1998). Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery* 42(3):518-525.

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., et al. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 7(5):392-401.

Stupp, R., Janzer, RC., Hegi, ME., et al. (2003). Prognostic factors for low-grade gliomas. *Semin Oncol* 30(6 Suppl 19):23-28.

Stupp, R., van den Bent, MJ., Hegi, ME. (2005). Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5(3):198-206.

Stupp, R., Mason, WP., van den Bent, MJ., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):987-996.

Stupp, R., Hegi, ME., van den Bent, MJ., et al. (2006). Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist* 11(2):165-180.

Stupp, R., Hegi, ME., Gilbert, MR., Chakravarti, A. (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol* 25(26):4127-4136.

Stupp, R., Hegi, ME. (2007). Methylguanine methyltransferase testing in glioblastoma: when and how? *J Clin Oncol* 25(12):1459-1460.

Stupp, R., Hegi, ME. (2007). Targeting brain-tumor stem cells. *Nat Biotechnol* 25(2):193-194.

Stupp, R., Hegi, ME. (2007). Neuro-oncology: oligodendroglioma and molecular markers. *Lancet Neurol* 6(1):10-12.

Suh, D., Olson, J. (1998). Management of Recurrent Malignant Primary Brain Tumors. Part I: Etiology, Clinical Diagnosis, and Treatment Options.

Contemporary Neurosurgery 30(11):1-6.

Sun, Y., Wang, Z., Zhou, D. (2013). Long non-coding RNAs as potential biomarkers and therapeutic targets for gliomas. *Med Hypotheses*. 81(2):319-21.

The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. (2008). *Nature* 455(7216):1061-1068.

Tsai, M. C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamaparast, N., Wang, J. K., Lan, F., et al. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329:689–693.

Trosko, JE., Chang, CC., Upham, BL., Tai, MH. (2004). Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann N Y Acad Sci* 1028:192-201.

Tufarelli, C., Stanley, JA., Garrick, D., et al. (2003). Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nature Genetics* 34 (2):157–65.

Tunici, P., Irvin, D., Liu, G., et al. (2006). Brain tumor stem cells: new targets for clinical treatments? *Neurosurgical FOCUS* 20(4):E27.

Uyeno, S., et al. (1996). IGF2 but not H19 shows loss of imprinting in human glioma. *Cancer Res*. 56(23):5356-9.

Vaquero, J., Zurita, M., Morales, C., Cincu, R., Oya, S. (2000). Expression of vascular permeability factor in glioblastoma specimens: correlation with tumor vascular endothelial surface and peritumoral edema. *J Neurooncol* 49(1):49-55.

Vaquero, J., Zurita, M., Morales, C., Oya, S., Coca, S. (2000). Prognostic significance of endothelial surface score and MIB-1 labeling index in glioblastoma. *J Neurooncol* 46(1):11-16.

Vaquero, J., Coca, S. (2004). *Patología Tumoral del Sistema Nervioso*. Madrid,

Barcelona: EDIMSA.

Verhaak, R.G., et al. (2010). An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98-110.

Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469:14–322.

Walker, MD., Alexander E, Jr., Hunt, WE., et al. (1978). Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 49(3):333-343.

Walker, MD., Green, SB., Byar, DP., et al. (1980). Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 303(23):1323-1329.

Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D., and Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med.* 206:1457–1464.

Wang, LF., Fokas, E., Bieker, M., et al. (2008). Increased expression of EphA2 correlates with adverse outcome in primary and recurrent glioblastoma multiforme patients. *Oncol Rep* 1:151-156,

Wang, KC., and Chang, HY. (2011). Molecular mechanisms of long non-coding RNAs. *Mol Cell* 6:904-914.

Wang, P., Ren, Z., Sun, P. (2012). Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation. *J Cell Biochem.* 113(6):1868-74.

Wang, P., et al. (2015). Long non-coding RNA CASC2 suppresses malignancy in human gliomas by miR-21. *Cell Signal.* 27(2):275-82.

Wang, Q., et al. (2016). A novel cell cycle-associated lncRNA, HOXA11-AS, is transcribed from the 5-prime end of the HOXA transcript and is a biomarker of progression in glioma. *Cancer Lett.* 373(2):251-9.

Wang, Y., Chen, L., Bao, Z., et al. (2011). Inhibition of STAT3 reverses alkylator resistance through modulation of the AKT and  $\beta$ -catenin signaling pathways. *Oncol Rep* 5:1173-1180.

Wang, Y., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Yin, H., and Han, B. (2015). CRNDE, a long- noncoding RNA, promotes glioma cell growth and invasion through mTOR signaling. *Cancer Lett.* 367:122–128.

Watkins, S., and Sontheimer, H. (2012). Unique biology of gliomas: challenges and opportunities. *Trends Neurosci.* 35, 546–556.

Wen, PY., et al. (2012). Current clinical development of PI3K pathway inhibitors in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 14(7):819-29.

Wibom, C., et al. (2015). Investigation of established genetic risk variants for glioma in prediagnostic samples from a population-based nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 24(5):810-6.

Wrensch, M., Weinberg, A., Wiencke, J., et al. (1997). Does prior infection with varicella-zoster virus influence risk of adult glioma? *Am J Epidemiol* 145(7):594-597.

Wrensch, M., Lee, M., Miike, R., et al. (1997). Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls. *Am J Epidemiol* 145(7):581-593.

Wrensch, M., Yost, M., Miike, R., et al. (1999). Adult glioma in relation to residential power frequency electromagnetic field exposures in the San Francisco Bay area. *Epidemiology* 10(5):523-527.

Wrensch, M., Miike, R., Lee, M., Neuhaus, J. (2000). Are prior head injuries or diagnostic X-rays associated with glioma in adults? The effects of control selection bias. *Neuroepidemiology* 19(5):234- 244.

Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., Berger, MS. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol* 4(4):278-299.

Wrensch, M., Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Bondy, M., Berger, M., Aldape, K.D. (2005). The molecular epidemiology of gliomas in adults. *Neurosurg Focus* 19(5):E5.

Wutz, A., Gribnau, J. (2007). X inactivation Xplained. *Current Opinion in Genetics & Development* 17(5):387–93.

Xiang, J., Guo, S., Jiang, S., Xu, Y., Li, J., Li, L., et al. (2016). Silencing of long non-coding RNA MALAT1 promotes apoptosis of glioma cells. *J. Korean Med. Sci.* 31:688–694.

Xiaochun, J., et al (2016). Increased level of H19 long noncoding RNA promotes invasion, angiogenesis, and stemness of glioblastoma cells. *J Neurosurg* 124:129–136.

Xiaoyong Q., Jie Y., Peiliang G., Xiangping F. et al. (2014). LncRNA TSLC1- AS1 is a novel tumor suppressor in glioma. *Int J Clin Exp Pathol* 7(6):3065-3072.

Yan, Y., Zhang, L., Jiang, Y., Xu, T., et al. (2015). LncRNA and mRNA interaction study based on transcriptome profiles reveals potential core genes in the pathogenesis of human glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol.* 141(5):827-38.

Yan, Y., et al. (2017). An insight into the increasing role of LncRNAs in the pathogenesis of gliomas. *Front Mol Neurosci.* 2017:10:53.

Yao, J., Zhou, B., Zhang, J., Geng, P., Liu, K., Zhu, Y., et al. (2014). A new tumor suppressor LncRNA ADAMTS9-AS2 is regulated by DNMT1 and inhibits migration of glioma cells. *Tumour Biol.* 35, 7935–7944.

Yao, Y., et al. (2015). Knockdown of long non-coding RNA XIST exerts tumor-suppressive functions in human glioblastoma stem cells by up-regulating miR-152. *Cancer Lett.* 359(1):75-86.

Yasargil, MG. (1996). *Microneurosurgery of CNS Tumors.* Stuttgart, New York. Yilong, Y., et al. (2015). Knockdown of long non-coding RNA XIST exerts tumor-suppressive functions in human glioblastoma stem cells by up-

regulating miR-152. *Cancer Letters* 359:75–86.

Yin, D., He, X., Zhang, E., Kong, R., De, W., and Zhang, Z. (2014). Long noncoding RNA GAS5 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Med. Oncol.* 31, 253.

Yoshida, T., Kawano, N., Oka, H., Fujii, K., Nakazato, Y. (2000). Clinical cure of glioblastoma--two case reports. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 40(4):224-229.

Yu, JS., Yong, WH., Wilson, D., Black, KL. (2000). Glioblastoma induction after radiosurgery for meningioma. *Lancet* 356(9241):1576-1577.

Yu, W., Gius, D., Onyango, P., et al. (2008). Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature* 451(7175):202–6.

Yuan, J., et al. (2014). A long noncoding RNA activated by TGF-beta promotes the invasion- metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 25:666–681.

Yue, H., et al. (2016). MDC1-AS, an antisense long noncoding RNA, regulates cell proliferation of glioma. *Biomed Pharmacother.* 81:203-9.

Yue, Y., et al. (2015). Long non-coding RNA Gm15577 is involved in mouse cerebellar neurogenesis. *44(7):504-8.*

Zhang, JX., et al. (2013). Chinese Glioma Cooperative Group. HOTAIR, a cell cycle-associated long noncoding RNA and a strong predictor of survival, is preferentially expressed in classical and mesenchymal glioma. *Neuro Oncol.* 15(12):1595-603.

Zhang, K., et al. (2015). Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner. *Oncotarget.* 6(1):537-46.

Zhang, W., Fine, HA. (2006). Mechanisms of Gliomagenesis. In: Janigro D, editor. *The Cell Cycle in the Central Nervous System.* Totowa, New Jersey: Humana Press, 2006:449-462.

Zhang, X., et al. (2012). Long non-coding RNA expression profiles predict clinical phenotypes in glioma. *Neurobiol Dis.* 48(1):1-8.

Zhang, XQ., et al. (2015). IDH1 mutation-associated long non-coding RNA expression profile changes in glioma. *J Neurooncol.* 125(2):253-63.

Zhang XQ, Leung GK. (2014). Long non-coding RNAs in glioma: functional roles and clinical perspectives. *Neurochem Int.* 77:78-85.

Zhang, XQ., et al. (2013). Long non-coding RNA signature in glioblastoma multiforme predicts survival. *Neurobiol Dis.* 58:123-31.

Zhao, T., et al (2015). Computational identification of epigenetically regulated lncRNAs and their associated genes based on integrating genomic data. *FEBS Lett.* 589(4):521-31.

Zhao, X., Wang, P., Liu, J., Zheng, J., Liu, Y., Chen, J., et al. (2015). Gas5 exerts tumor-suppressive functions in human glioma cells by targeting miR-222. *Mol. Ther.* 23, 1899–1911.

Zhen, L., Yun-Hui, L., Hong-Yu, D., Jun, M., and Yi-Long, Y. (2016). Long noncoding RNA NEAT1 promotes glioma pathogenesis by regulating miR-449b-5p/c-Met axis. *Tumour Biol.* 37:673–683.

Zheng, J., et al. (2015). CRNDE affects the malignant biological characteristics of human glioma stem cells by negatively regulating miR-186. *Oncotarget.* 6(28):25339-55.

Zheng, J., Liu, X., Wang, P., Xue, Y., Ma, J., Qu, C., et al. (2016). CRNDE promotes malignant progression of glioma by attenuating miR-384/PIWIL4/STAT3 axis. *Mol. Ther.* 24, 1199–1215.

Zhi, F., et al. (2015). The Use of Three Long Non-Coding RNAs as Potential Prognostic Indicators of Astrocytoma. *PLoS One.* 10(8):e0135242.

Zhu, Z., et al. (2014). Targeting self-renewal in high-grade brain tumors leads to loss of brain tumor stem cells and prolonged survival. *Cell Stem Cell* 15:185-98.

Zhu, Y., Zhang, X., Qi, L., Cai, Y., Yang, P., Xuan, G., et al. (2016). HULC long noncoding RNA silencing suppresses angiogenesis by regulating ESM-1 via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human gliomas. *Oncotarget* 7:14429–14440.

Zwart, R., Sleutels, F., Wutz, A., Schinkel, AH., Barlow, DP. (2001). Bidirectional action of the Igf2r imprint control element on upstream and downstream imprinted genes. *Genes & Development* 15(18):2361–6.