



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCENCIAS MOLECULARES

**METODOLOGÍAS AVANZADAS EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE
GLIOMAS CEREBRALES BASADAS EN RESONANCIA MAGNÉTICA**

MARIA LUISA GANDÍA GONZALEZ

MADRID, 2021

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento y afecto al Dr. Roda Frade, por introducirme en el mundo de la ciencia, él me enseñó el camino y principios tan importantes como el rigor científico. Quiero también dar las gracias a mis directores de tesis, al Dr. Sebastián Cerdán García-Esteller, por acogerme en el Laboratorio de Resonancia Magnética del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (C.S.I.C./U.A.M., Madrid) y enseñarme día a día, y al Dr. Juan Solivera por todo su apoyo y su contribución en este proyecto.

Gracias a la Dra. Pilar López-Larrubia y a todo el personal del Laboratorio de Resonancia Magnética del Instituto de Investigaciones científicas “Alberto Sols” y también a la Dra. María Luisa García Martín, responsable del BIONAND por el análisis mediante HRMAS y LC Model de las biopsias tumorales.

Quiero mostrar también mi reconocimiento a la Dra. Laura Barrios (Centro Técnico de Informática, C.S.I.C.), por su calidez y amistad y por realizar los estudios estadísticos utilizados en este trabajo.

Gracias también al equipo del Profesor Raúl Luque Huertas, responsable del Laboratorio de OncObesidad y Metabolismo del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), en especial a Antonio Carlos Fuentes-Fayos, becario predoctoral del departamento, por su ayuda en la realización de los análisis genéticos del presente proyecto.

Sin todos ellos, este trabajo de Tesis Doctoral no hubiera sido posible.

Gracias al Instituto Carlos III por la beca FIS PI 2017/00361 y a la Comunidad de Madrid por la beca FEDER B2017/BMD3688, así como al Grupo de Trabajo de la SENECA por la beca Gebro 2020.

Asimismo, quiero manifestar mi gratitud a mi marido, que me apoya incansablemente cada día para que pueda realizar proyectos como este. También a mis padres por su paciencia y apoyo, y sobretodo a mi hijo Alessandro, que pasa largas horas esperando a que su mamá termine de trabajar y se sienta a mi lado mientras sigo con mis investigaciones.

A mi padre

Resumen

Esta Tesis Doctoral proporciona un estudio integrado de la Supervivencia Global (SG) postquirúrgica en pacientes (n=166) con glioma cerebral de diversos grados, combinando la información clínica e histopatológica, con el perfil metabólico y genético del tumor. Brevemente, se obtuvieron biopsias del glioma de cada paciente mediante intervención neuroquirúrgica, determinando sus características histopatológicas y su perfil metabólico y genético. El metaboloma tumoral se investigó mediante Resonancia Magnética *ex vivo* y el perfil genético, mediante ensayos de expresión y mutación génica. Brevemente, se prepararon dos bases de datos, una retrospectiva (66 pacientes, 1992-1998), conteniendo principalmente biomarcadores clínicos y metabólicos, y otra prospectiva (100 pacientes, 2015-2020) conteniendo, además de los anteriores, biomarcadores genéticos. Posteriormente, se realizaron análisis estadísticos univariante, multivariante e interactómico, para seleccionar jerárquicamente el biomarcador (o colección de biomarcadores) que mejor describen la SG y sus interacciones. El estudio retrospectivo demostró correlaciones positivas entre la SG y el contenido de *myo*-inositol y glicerol-fosforilcolina, y correlaciones negativas entre la SG y los niveles de alanina y fosforil-colina, desarrollando un Árbol de Clasificación y Regresión (Classification Regression Tree, CRT) con una precisión predictiva del 84.7%. El estudio prospectivo confirmó la correlación positiva entre el nivel de *myo*-inositol y la SG, con contribuciones bifásicas de Colina, Glutamato y Glicerol-fosforilcolina, mostrando una precisión predictiva de 78,5%. El estudio genético mostró una correlación positiva de la SG con la sobreexpresión de genes del metabolismo de glutamina (GLUL, GLS, GLUD1), producción de glicerol-fosforilcolina (SMPD1 y GLPD1), y síntesis de glicina (SHMT1) y una correlación negativa con la sobreexpresión de fosfolipasas PLAG2A. El estudio interactómico ayudó a comprender las relaciones entre ambos sistemas y fue capaz de clasificar los tumores IDH-mutados mediante análisis de componentes principales y análisis de *clústers* a partir de sus perfiles metabólicos y de expresión génica. En conclusión, los resultados de esta Tesis proporcionan, hasta donde conocemos, una de las bases de datos más extensas de SG en pacientes portadores gliomas, mostrando que es posible mejorar las predicciones previas combinando la información clínica e histopatológica con

abordajes metabolómicos y genómicos avanzados, e identificando potenciales futuros marcadores pronósticos y terapéuticos.

Summary

In this PhD Thesis I provide an integrated study of post-surgical Overall Survival (OS) in patients bearing gliomas of various grades (n=166), combining clinical and histopathological information, with advanced metabolomic and genomic approaches. Briefly, we obtained biopsies from the gliomas of every patient by intracranial surgery, determining its histopathological characteristics, and its metabolomic and genomic profiles. The metabolome was investigated using *ex vivo* Magnetic Resonance methods and the genome using assays of genetic expression and mutation. Briefly, we prepared two independent data bases, one retrospective (66 patients, 1992-1998), containing mainly clinical and metabolomic biomarkers, and one prospective (100 patients, 2015-2020), containing, in addition to the former, the genetic biomarkers. Then, we implemented univariate, multivariate and interactome statistical analyses to select, hierarchically, the optimal biomarker (or combination of biomarkers) that best describe OS, and its interactions. The retrospective study demonstrated positive correlations between OS and the *Myo*-inositol and Glycerol-phosphorylcholine content, and negative correlations between OS and the alanine and phosphorylcholine levels, enabling a Classification Regression Tree (CRT) with a predictive precision of 84.7%. The prospective study confirmed the positive correlation between OS and the *myo*-inositol levels, with additional biphasic contributions of Choline, Glutamate and Glycerol-phosphorylcholine. The prospective CRT resulted in a prognostic precision of 78,5%. The predictive genetic study depicted a positive correlation of OS with the overexpression of genes from glutamine metabolism (GLUL, GLS, GLUD1), glycerol-phosphorylcholine production (SMPD1 y GLPD1), and glycine synthesis (SHMT1) and a negative correlation with the overexpression of phospholipases PLAG2A. The interactomic approach provided a better understanding of the correlation between both systems and it could classify the tumors by IDH status using tumor genetic and metabolic profiles. In conclusion, the results of this Thesis provide, to my knowledge, the most extensive database from OS in patients bearing gliomas, showing that it becomes possible now, to improve the accuracy of previous predictions, combining clinical information with advanced metabolomic and

genomic approaches. By means of this interactomic approach we were able to identify potential future prognostic and therapeutic biomarkers for human glioma.

INDICE

1. Introducción	1
1.1. Tumores cerebrales y gliomas	1
1.2. Clasificación de los gliomas según la Organización Mundial de la Salud (OMS)	2
1.3. Teorías de la formación de células tumorales a partir de células germinales.....	3
1.4. Reprogramación genética y metabólica en gliomas.....	7
1.4.1. Reprogramación genética	7
1.4.2. Reprogramación metabólica	10
1.5. Metabolómica de gliomas mediante Resonancia Magnética ...	13
1.5.1. Imagen y espectroscopía por Resonancia Magnética	13
1.5.2. Metabolómica.....	22
1.6. Criterios de supervivencia	24
2. Objetivos	27
3. Materiales y Métodos	29
3.1. Generación de la base de datos y creación de un biobanco de muestras de gliomas cerebrales.....	29
3.2. Metodología para la obtención de perfiles metabólicos y genéticos	30
3.2.1. Estudio retrospectivo.....	30
3.2.2. Estudio prospectivo.....	32
3.3. Evaluación de la supervivencia	41
3.3.1. Estudio retrospectivo.....	41
3.3.2. Estudio prospectivo.....	43
4. Resultados	47
4.1. Estudio retrospectivo	47
4.1.1. Características clínicas	47
4.1.2. Análisis estadístico univariante.....	48

4.1.3. Árbol de clasificación y regresión.....	51
4.2. Estudio prospectivo	54
4.2.1. Características clínicas	54
4.2.2. Análisis estadístico univariante	56
4.2.3. Clasificación y regresión mediante árboles jerarquizados ...	59
4.2.4. Genética y Supervivencia Global	64
4.2.5. Interactómica.....	71
5. Discusión	85
5.1. Supervivencia Global y perfil metabólico: Estudio retrospectivo	85
5.2. Supervivencia Global e interactómica: Estudio prospectivo	87
6. Conclusiones	101
7. Bibliografía	103
8. Anexos	117

CLAVE DE ABREVIATURAS

2-HG	2-hidroxiglutarato
Ac	Acetato
ADN	Acido desoxirribonucleico
AKT	Proteína kinasa B
Ala	Alanina
AR-ERM ¹ H	Espectroscopía por Resonancia Magnética de proton <i>in vitro</i> de Alta Resolución
ARN	Ácido ribonucleico
As	Antisentido (variantes de Homo Sapiens)
Ascorb	Ácido ascórbico
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosín-trifosfato
ATRX	Alfa talasemia/retraso mental asociado a Síndrome X
BCAT1	Aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada
bHb	Beta-hidroxibutirato
CDS	Secuencias codificantes
CDIPT	CDP-Diacilglicerol-Inositol-3-Fosfatidiltransferasa
CHKA	Colina kinasa A
CIC	Represor transcripcional capicúa
CMPG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación
Cr	Creatina
CRLB	Cramér–Rao Lower Bound
CRT	Árbol de clasificación y regresión
CS	Citrato sintasa
Cys	Cysteína
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ERMN ¹ H	Espectroscopía por resonancia magnética nuclear de protón <i>in vivo</i>
ESM	Error estándar de la media
ETNK1	Etanolamina kinasa 1
fCho	Colina libre
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGFR	Receptor de factor de crecimiento fibroblástico
FID	Descenso de la Inducción Magnética Libre
FUBP1	Far Upstream Element Protein 1
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAD1(GAD25)	Glutamato descarboxilasa 1 (25 kDa)
GAD1 (GAD67):	Glutamato descarboxilasa 1 (67 kDa)
GAG	Glioma de Alto Grado
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GBG	Glioma de bajo grado
GBM	Glioblastoma Multiforme
GCK	Glucocinasa (Hexocinasa IV)
Gd	Gadolinio
Gln	Glutamina
GLPD1	Glycoprotein phospholipase D1
GLS	Glutaminasa
Glu	Glutamato
GLUD1	Glutamato deshidrogenasa 1
GLUL	Glutamato-ammonia ligasa
GLUT2	Transportador de glucosa 2
Gly	Glicina
GPC	Glicerol-fosforil-colina
GPT	Alanina aminotransferasa 1
GroPEtn	Glicerol-fosforil-Etanolamina
GSH	Glutation
Gua	Guanidina
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
HIF1A	Factor inducible por Hipoxia 1 subunidad A

HIF2A	Factor inducible por hipoxia 2 subunidad A
HIF3A	Factor inducible por hipoxia 3 subunidad A
HK1	Hexokinasa 1
HK2	Hexokinasa 2
HK3	Hexokinasa 3
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPRT	Fosforibosil-transferasa de Hipoxantina
HRMAS	High Resolution Magic Angle Spinning
Hypo-Tau	Hipotaurina
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IDH-mut	Isocitrato deshidrogenasa mutada
IDH-wt	Isocitrato deshidrogenasa salvaje (wild-type)
IDT	Integrated DNA Technologies
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico
Ile	Isoleucina
ISYNA1	Inositol-3-fosfato sintasa 1
K	Constante de Equilibrio
Lac	Lactato
Leu	Leucina
LC Model	Linear Combination of Model Spectra
LDHA	Lactato deshidrogenasa A
LDHB	Lactato deshidrogenasa B
Lip	Lípidos
m	Multiplete
MCC	Matriz de clasificación-confusión
MET	Proto-oncogen MET
MGL	Modelo General Lineal
MGMT	Metilguanidina-ADN-Metil-Transferasa
MHz	Megahertzios
MI	<i>Myo</i> -inositol
MRSI	Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging
H3 K27M	Mutaciones de sustitución de Lisina a Metionina en el codón 27 en la histona H3
NAA	Ácido N-acetil-aspártico

NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotido-Fosfato reducido
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF 1	Neurofibromatosis tipo 1
NF 2	Neurofibromatosis tipo 2
NOS	Not otherwise specified
Pb	Pares de base (variante de Homo Sapiens)
PC	Fosforil-colina
PCa	Piruvato carboxilasa
PCr	Fosfocreatina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCYT1A	Colina-fosfato citidililtransferasa 1 alfa
PDE	Fosfodiesteres
PDE1A	Fosfodiesterasa 1A
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PDHA1	Piruvato deshidrogenasa alfa subunidad 1
PDHA2	Piruvato deshidrogenasa alfa subunidad 2
PDK1	Piruvato deshidrogenasa kinasa 1
PE	Fosfo-Etanolamina
Phe	Fenilalanina
PKFM	Fosfofructokinasa (músculo)
PKM	Piruvato kinasa M1/2
PLA2G2A	Fosfolipasa A2 (Grupo IIA)
PLCG1	Fosfolipasa C gamma 1
ppm	partes por millón
PtdCho	Fosfatidilcolina
PtdEtn	Fosfatidiletanolamina
PtdIns	Fosfatidilinositol
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RF	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singlete
Scyllo-I	Scyllo-Inositol

seg	Segundos
SG	Supervivencia Global
SHMT1	Serina-hidroximetil-transferasa 1
SIRT1	Sirtuína 1 (desacetilasa dependiente de NAD)
SLC6A1	Transportador de solutos, familia 6-1
SLC6A17	Transportador de solutos, familia 6-17
smn	Semanas
SMPD1	Esfingomielina fosfodiesterasa 1
Sn	Sentido (variante de Homo Sapiens)
SNC	Sistema Nervioso Central
t	Triplete
Tau	Taurina
TCA	Tricarboxylic Acid Cycle (Ciclo de Krebs)
tCho	Colina total
tCr	Creatina total
TE	Tiempo de echo
TERT	Transcripasa reversa de la Telomerasa
TGF	Transforming Growth Factor
TP53	Proteína tumoral 53
TR	Tiempo de Relajación
Val	Valina
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor
OMS	Organización Mundial de la Salud

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tumores cerebrales y gliomas.

Los tumores cerebrales son neoplasias con morbilidad y mortalidad muy elevada. A nivel mundial, representan un 1,6% de todos los procesos oncológicos diagnosticados anualmente y causan un 2,8% de las muertes por cáncer, según el último registro de la Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer del 2018¹. Ocupan el puesto número 17 en incidencia mundial, con 296.851 nuevos casos registrados cada año, pero quedan en el puesto número 13 en cuanto a mortalidad por cáncer. Su incidencia es mayor en los países desarrollados, como ocurre con la mayoría de procesos oncológicos, probablemente por el mayor acceso a recursos diagnósticos en estas naciones (Figura 1). Aún así, su posición relativa con respecto al resto de cánceres en incidencia y mortalidad es similar en Europa y en el mundo, independientemente del nivel de desarrollo del país.

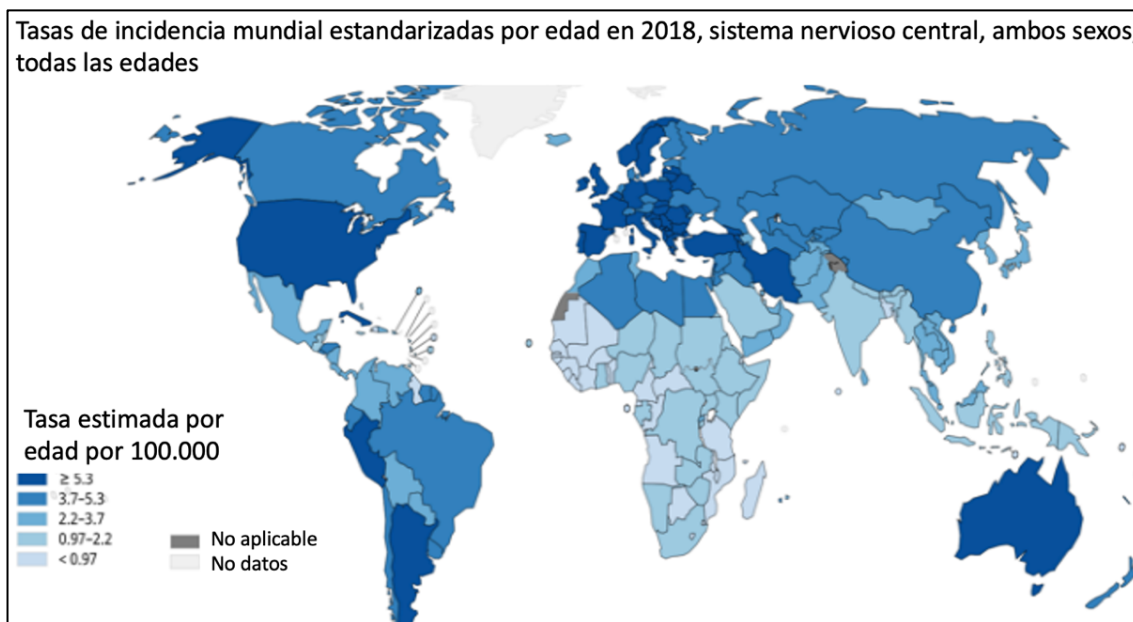


Figura 1. Distribución de tumores cerebrales a nivel mundial según GLOBOCAN 2018²

Entre los cánceres cerebrales, los gliomas representan los tumores primarios más frecuentes, alcanzando el 81%. Los factores de riesgo más importantes son; la exposición a radiaciones ionizantes, el déficit de vitamina D,

y algunas variantes genómicas o mutaciones genéticas hereditarias asociadas a síndromes como la neurofibromatosis tipos 1 y 2 (NF1 y 2), la esclerosis tuberosa, y los síndromes de Lynch o de Li-Fraumeni³. Los gliomas son más frecuentes en la raza blanca y en descendientes de herencia europea⁴.

1.2. Clasificación de los gliomas según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Las sucesivas clasificaciones de los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) según la OMS, han ido modificando progresivamente las diferentes entidades diagnósticas (Tabla 1)^{5,6,7,8}

Tabla 1. Clasificación de tumores gliales según la OMS en 2007⁷ y 2016⁸.

TIPOS DE GLIOMAS	OMS 2007	OMS 2016
Astrocitoma Difuso	Fibrilar	IDH-mutado
	Gemistocítico	IDH-no mutado
	Protoplásmico	NOS
Astrocitoma Anaplásico		IDH-mutado
		IDH-no mutado
		No especificado
Glioblastoma	Glioblastoma de células gigantes	IDH-no mutado -glioblastoma de células gigantes -gliosarcoma -glioblastoma epiteloide
	Gliosarcoma	IDH-mutado NOS
Gliomatosis Cerebri ¹		
Glioma de línea media ²		Glioma Difuso de línea media, H3 K27M-mutado
Oligodendroglioma	Oligodendroglioma	IDH-mutado Co-delección 1p/19q No especificado
		Oligodendroglioma anaplásico
Oligoastrocitoma	Oligoastrocitoma	Oligoastrocitoma NOS
	Oligoastrocitoma anaplásico	Oligoastrocitoma anaplásico NOS

¹solo en WHO 2007, ²solo en WHO 2016, NOS: Not otherwise specified

La última clasificación, emitida en 2016, supone una modificación significativa de la anterior, emitida en 2007, incluyendo como criterio adicional el uso de parámetros moleculares, como las mutaciones de la isocitrato deshidrogenasa (IDH) y la codeleción 1p19q (brazo corto del cromosoma 1 y largo del 19).

La IDH es un enzima que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato para formar 2-hidroxiglutarato (2-HG) en el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Las mutaciones en el codón 132 de la isoenzima 1 y en el codón 172 de la isoenzima 2 se han relacionado con los gliomas cerebrales. Además, en esta clasificación se eliminan diagnósticos anteriores como el astrocitoma fibrilar o protoplásmico, y manteniendo solamente el subtipo gemistocítico.

Brevemente, un astrocitoma puede clasificarse como difuso (grado II), anaplásico (grado III) o glioblastoma (grado IV), y dentro de cada entidad, puede ser; IDH-mutado, IDH-no mutado (o salvaje, en inglés “wild-type”), o NOS (Not Otherwise Specified, no especificado), sin firma molecular precisa. A todos ellos se añade el glioma difuso de línea media, con comportamiento biológico y clínico completamente diferente al resto, mucho más agresivo, asociado a la mutación de sustitución de lisina por metionina en el codón 27 en la histona H3 (mutación de la histona H3 K27M). Por otro lado, los oligodendrogliomas se dividen en IDH-mutado y con la codeleción 1p/19 q, o inespecíficos. Los oligoastrocitomas y el oligoastrocitoma anaplásico son diagnósticos que no se recomienda utilizar⁸.

1.3. Teorías de la formación de células tumorales a partir de células germinales.

Las células precursoras tumorales son un subgrupo de células que tienen la capacidad de autorenovarse y que, tras adquirir determinadas mutaciones, desarrollan una capacidad de proliferar ilimitada. Tradicionalmente, existen dos hipótesis que tratan de explicar cómo ocurre el fenómeno oncogénico:

- Hipótesis estocástica: Propone que todas las células del tumor tienen un potencial oncogénico similar, que se activa asincrónicamente, y poco a poco en determinadas células.
- Hipótesis jerárquica: Propone que tan solo un escaso subgrupo de células tiene la capacidad proliferativa y oncogénica.

En 1992, Reynolds y Weiss⁹ aislaron células madre neurales en el cerebro adulto del ratón, un hallazgo seguido rápidamente por diversas publicaciones que describían la persistencia de neurogénesis en el cerebro adulto de roedores, musarañas, monos y humanos¹⁰. Estas células madre neurales, cruciales para mantener normalmente la plasticidad y óptima función cerebral, persisten durante toda la vida en determinadas zonas cerebrales, como la zona subventricular y la zona subgranular¹¹. Ambas zonas contienen compartimentos, conocidos como “nichos neurogénicos”, que contienen células indiferenciadas, mitóticamente activas, y células progenitoras responsables de la homeostasis celular a lo largo de la vida del organismo (Figura 2).

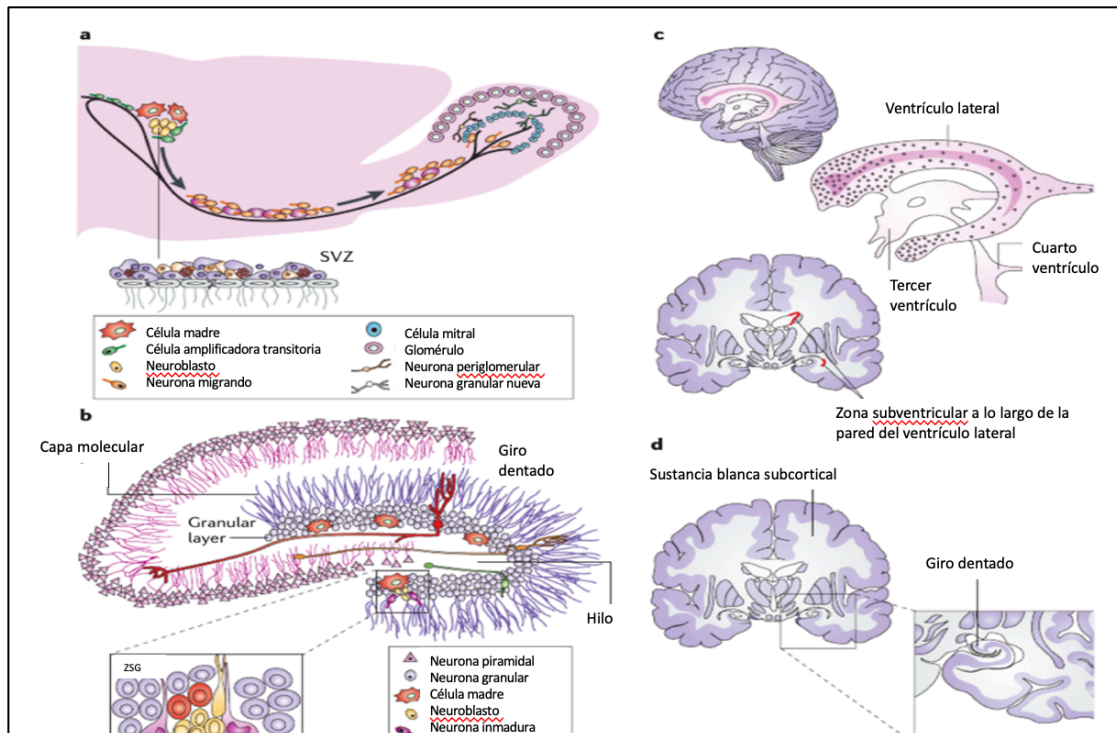


Figura 2. Localización de las células progenitoras neurales en las zonas subventricular y subgranular durante la edad adulta. Modificado de Sanai *et al.*¹²

Alcántara Llaguno *et al.*¹³ observaron una alta penetración de glioma en modelos de ratón en estos nichos, y describieron cómo la delección de genes como el de la NF1, de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) y la proteína tumoral 53 (TP53) conducía a la formación de Glioblastoma Multiforme (GBM) en modelos en ratones, revelando así el elevado potencial tumorigénico de las células progenitoras. Estas evidencias sugirieron que la

transformación de las poblaciones de células madre neurales, o de alguna de las células progenitoras en las que se dividen, también existentes en el cerebro del adulto, podrían originar las células tumorales (Figura 3). Las células madre neurales migrarían entonces, desde sus nichos a nivel subependimario en la zona subventricular, hasta el lugar donde se desarrollaría el tumor¹⁴, formando allí nuevos nichos tumorales. De entre todas las células progenitoras, las oligodendrocitarias, son las más abundantes en el cerebro adulto¹⁵.

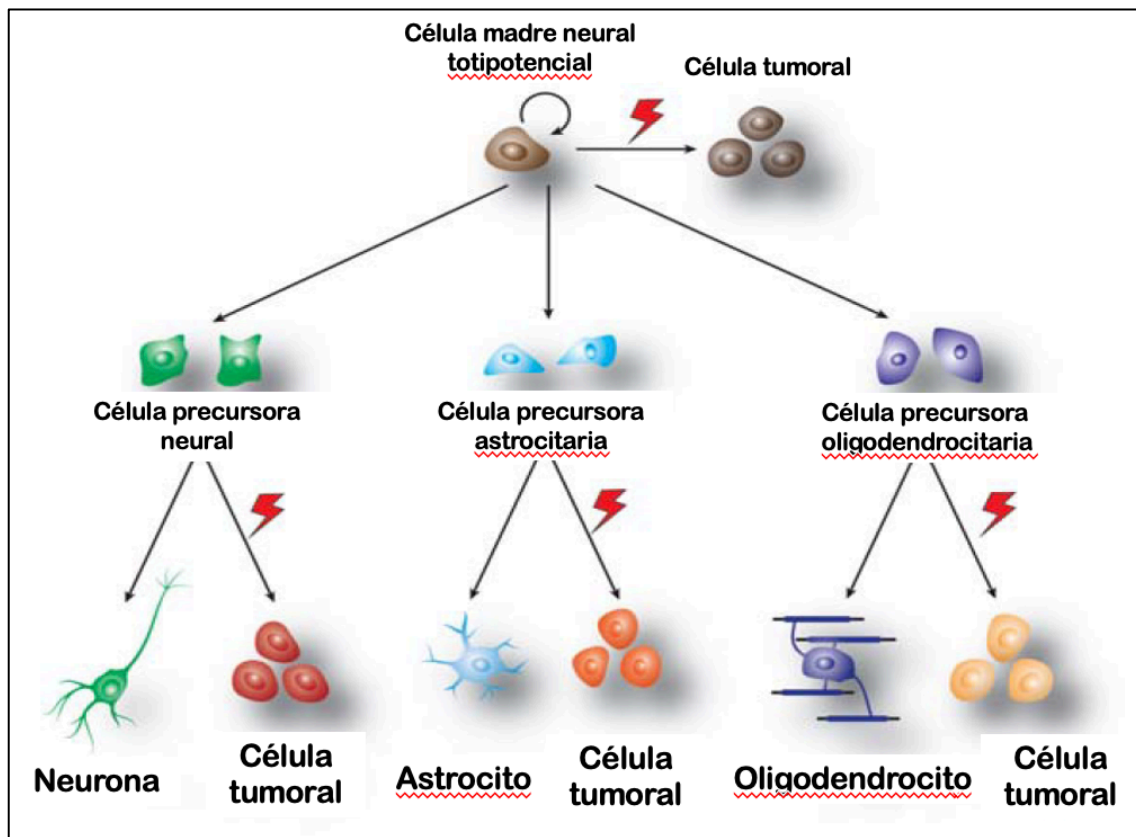


Figura 3. Esquema de renovación y diferenciación de las células madre neurales totipotenciales en células progenitoras neuronales (NPC), astrocitarias (APC) y oligodendrocitarias (OPC), que podrían sufrir transformación tumoral.¹⁵

Inicialmente, se pensaba que cada estirpe de célula progenitora originaba un tipo de tumor diferente. Así, las células progenitoras de oligodendrocitos serían las que producían oligodendrogliomas, tras su transformación maligna por la inactivación de TP53 y NF1¹⁶. Sin embargo, Alcántara Llaguno et al.¹⁷ demostraron que la misma secuencia mutacional oncogénica podía originar tumores diferentes dependiendo de la célula originaria, ya que consiguieron

obtener dos tipos diferentes de glioblastoma en función si la célula progenitora era neural, u oligodendrocitaria .

Posteriormente se evidenció que la secuencia mutacional genética es fundamental en este proceso, y que también puede ocurrir que diferentes tipos tumores se deriven de la misma célula progenitora, según el daño genético sufrido.¹⁸ Estas células progenitoras residen también en el tumor, en contacto directo con células endoteliales, y donde el microambiente permite el crecimiento tumoral.

Las células tumorales infiltran los tejidos circundantes mediante el crecimiento alrededor de la lámina basal de los vasos, deslizándose entre vasos y astrocitos reactivos, y separándose progresivamente de sus vasos de aporte sanguíneo, rompiendo así la barrera hematoencefálica¹⁹. Se inducen entonces una serie de mediadores angiogénicos como la angiopoyetina 1 y 2 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés vascular endotelial growth factor), que desencadenan la disociación de los pericitos, la proliferación de las células endoteliales, la dilatación de los vasos, la degradación de la lámina basal y la fuga y depósito extracelular de fibrina²⁰. A partir de ahí, el tumor naciente está sometido a una situación de hipoxia, debida en parte al desequilibrio entre la alta tasa proliferativa de las células madre gliales y a la baja tasa de células endoteliales, apareciendo zonas de necrosis central.

Esta hipoxia activa factores pro-angiogénicos como las angiopoyetinas 1 y 2, factor de crecimiento transformante BB/ Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (TGF-BB/PDGFR, del inglés Transforming Growth Factor BB/ Platelet Derived Growth Factor Receptor) y VEGF/VEGFR (Vascular Endotelial Growth Factor/y su receptor) a través de las rutas de señalización de los Factores Inducibles por Hipoxia HIF 1 y 2 (Hipoxia-Inducible Factors).

Para que el tumor progrese es necesaria cierta inmunotolerancia²¹. Las células inmunitarias del SNC son macrófagos de la microglía y macrófagos asociados al tumor, que llegan a través de la sangre, permiten el crecimiento y la invasión tumoral a través de diferentes vías de activación y mediadores inflamatorios.

Las células madre gliales segregan periostina, que recluta macrófagos asociados al tumor y promueve el crecimiento del glioma a través de la integrina

$\alpha 5\beta 3$. El TGF- β segregado por los macrófagos induce metaloproteinasas MMP-2 y 9 para la invasión tumoral, promoviendo también la polarización de la microglía/macrófagos en el fenotipo inmunosupresivo M2 que aumenta la capacidad de los macrófagos para inhibir la proliferación de células T, con lo que se promueve la progresión tumoral. Las células supresoras mieloides también median la inmunosupresión y el crecimiento tumoral, interaccionando con las células madre gliales, principalmente con los monocitos inmunosupresores, y otras poblaciones de células T.

Finalmente, los astrocitos reactivos que se asocian al glioma favorecen la invasión y progresión, ejerciendo de células inmunoprotectoras e interactuando con las células tumorales mediante la secreción de citoquinas específicas²².

1.4. Reprogramación genética y metabólica en gliomas.

1.4.1. Reprogramación genética

Las células precursoras adquieren progresivamente determinadas alteraciones genéticas que dan lugar al subtipo tumoral, estimándose que una célula precursora sufre, antes de transformarse en tumoral, entre 4 y 7 modificaciones genéticas implicando, entre otros; cambios en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN), número aberrante de copias de ADN, reorganización cromosómica y, modificaciones en la metilación del ADN²³.

La célula progenitora no es el único determinante el tipo de tumor desarrollado sino que, la misma célula progenitora puede originar tumores diferentes, según la vía oncogénica activada. En efecto, autores como Lindberg et al.¹⁸ demostraron que activando células progenitoras oligodendrocíticas pudieron obtener diferentes tumores, tanto oligodendrogliales como astrocitarios en función de la vía oncogénica activada. Así, la sobreexpresión del factor de crecimiento derivado de las plaquetas B (PDGF-B, Platelet Derived Growth Factor B) producía oligodendrogliomas II y III mientras que la activación K-ras/AKT originaba los astrocitomas III y IV.

La Figura 4 resume las secuencias oncogénicas más importantes, y cómo influyen en el desarrollo de los diferentes grados de glioma. La subdivisión más clara se establece entre el glioblastoma primario y secundario. Actualmente, existe evidencia de que las células madre precursoras del glioblastoma primario

y secundario son diferentes²⁴. Beier et al.²⁵ encontraron que el número de células que expresaban CD133+ era significativamente mayor en GBM primarios, mientras que en los secundarios la mayor parte eran CD133-. Estos dos tumores muestran claras diferencias biológicas y clínicas, que habían sido explicadas por las diferentes alteraciones genéticas que podrían haber adquirido.

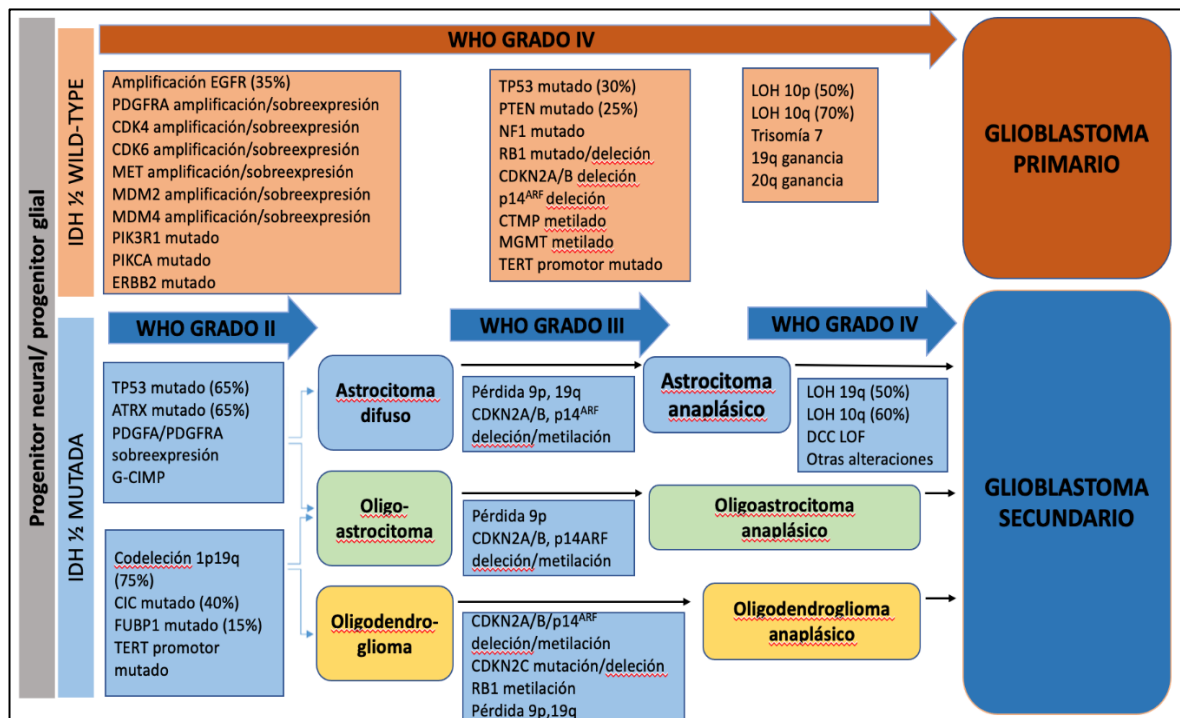


Figura 4. Secuencias de reprogramación genética de las células progenitoras neurales o gliales, que pueden conducir hasta su transformación en células tumorales de diferentes grados de glioma¹⁵.

De esa manera de las células progenitoras originarían un GBM primario, el grupo más frecuente y con mayor agresividad, cuando no se produce la mutación IDH1/2. El resto de gliomas presentarían la mutación IDH1/2, y en función de la célula progenitora y de la secuencia oncogénica, podrían encontrarse componentes astrocitarios (astrocitoma difuso), oligodendrocitarios (oligodendrogliomas), o ambos (oligoastrocitomas).

La codeleción 1p/19q es la segunda mutación más importante tras la IDH1/2, ya que se encuentra en más del 75% de los tumores con componente oligodendroglioma, de manera que el hallazgo de esta mutación resulta muy valioso para el diagnóstico del subtipo tumoral.

Los gliomas con la mutación IDH1/2 se forman inicialmente como tumores de bajo grado, y según van acumulando daño epigenético su agresividad aumenta, pasando a grado III (anaplásico), y evolucionando posteriormente a grado IV. Dicha mutación se encuentra en el 75-80% de los gliomas grado II y III, y constituye en la práctica, un marcador de GB secundario, evolución de los grados previos y de buen pronóstico.

Las mutaciones IDH1-2 son mutaciones en el exón 4 que codifican la expresión de las isocitrato deshidrogenasas 1 y 2 citosólicas y mitocondriales (IDH1: codón 132; IDH2: codón 140 y 172), que catalizan la conversión del alfa-cetoglutarato al oncometabolito 2-HG²⁶. Los niveles de 2-HG se correlacionan con el fenotipo hipermetilador de los gliomas secundarios y su acumulación ejerce efectos oncogénicos²⁶, suprimiendo la respuesta antitumoral de las células T.²⁷ Los enzimas derivados de la mutación IDH1 también inducen HIF-1 α .²⁸

La mutación de la alfa talasemia/retraso mental asociado a Síndrome X (ATRX, Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked) se encuentra en el 70-80% de los gliomas grado II y III está implicada en la recombinación, reparación y regulación transcripcional del ADN. Se localiza en el exón 21 del brazo largo del Cromosoma X y se trata de una helicasa que asiste el depósito de cromatina H3.3 en regiones teloméricas²⁹ Es responsable del mantenimiento de la longitud telomérica y modula el gen supresor de tumor p53 que puede encontrarse mutado en estos casos. Ambas mutaciones están ligadas al fenotipo astrocitario. La mutación del gen supresor tumoral TP53 se localiza en el cromosoma 17. Esta proteína protege contra daños en el ADN, por lo que su pérdida origina inestabilidad genética. Por otro lado, la inactivación del TP53 produce residuos de desaminación de la 5-metilcitosina, alterando los depósitos de p53, crucial para la formación del DNA.

La deleción del brazo corto del cromosoma 1, y del largo del cromosoma 19 (codeleción 1p19q), resulta en una translocación entre los cromosomas 1 y 19 y pérdida de heterocigosidad. Se presume que los brazos 1p y 19q contienen genes supresores de tumores. Esta mutación está ligada al fenotipo oligodendroglioma y se asocia, casi siempre, a la mutación IDH1 R132 o IDH2 R172, y en muchas ocasiones a la mutación en la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT, Telomerase Reverse Transcriptase), el represor

transcripcional capicúa (CIC, Capicua Transcriptional Repressor), proteína portadora 1 (FUBP1, Far Upstream Element -FUSE- Binding Protein 1) y metilguanidina-ADN metiltransferasa (MGMT)³⁰, en cambio su presencia excluye la presencia de las mutaciones ATRX y TP53 salvo rarísimas excepciones.

La inactivación del gen supresor tumoral PTEN, localizado en el cromosoma 10, se ha asociado con la progresión maligna a glioblastoma.

Adicionalmente, una gran lista de oncogenes y factores de crecimiento manifiestan su sobreexpresión o amplificación en los gliomas de alto grado, entre los que se han descrito PDGF, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), MET (protooncogen MET que codifica el receptor de Tirosina kinasa), factor de crecimiento fibroblástico b (FGFb, Fibroblast Growth Factor), FGF-2, el receptor de factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGFR1, Fibroblast Growth Factor Receptor 1), FGFR3, TGF- α y factor de crecimiento insulínico (IGF-1, Insulin Growth Factor). Algunos como EGFR se han asociado a la progresión a glioma de alto grado³¹, en cambio otros como PDGF se describen más al inicio de la tumorigénesis⁷.

También algunas moléculas angiogénicas son típicas de la progresión hacia glioma de alto grado. En particular, el VEGF es el que ha sido más claramente relacionado con el cambio angiogénico que experimentan estos tumores. Uno de los principales puntos del desarrollo angiogénico es la inducción de la transcripción del VEGF por los factores de la familia HIF.³² Otros factores que han sido descritos como relacionados con la angiogénesis tumoral PDGF, PDGF- β , angiopoyetina-2, la familia de factores de crecimiento fibroblástico, y el factor 1-alpha derivado de células estromales.

1.4.2. Reprogramación metabólica

El metabolismo característico de los astrocitos originales, se sustituye en los gliomas, por un metabolismo exacerbadamente glucolítico, incluso en presencia de oxígeno (efecto Warburg), y un ciclo de Krebs truncado, que funciona en reverso en algunos tramos mediante la carboxilación reductiva.³³ Ambas transformaciones están destinadas a proporcionar anapleróticamente, los precursores necesarios para sostener la elevada síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos que permiten el crecimiento tumoral (Figura 5).

En las células normales y en presencia de oxígeno, la energía se obtiene mediante la fosforilación oxidativa, donde cada molécula de glucosa se rompe glucolíticamente a dos moléculas de piruvato, que penetran posteriormente en el ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA, Tricarboxylic Acid Cycle) generando 36 moléculas adenosín-trifosfato (ATP), junto con una pequeña cantidad de lactato residual. En ausencia de oxígeno, y por tanto de actividad TCA, se produce la glicolisis anaerobia, donde cada molécula de glucosa genera tan sólo 2 moléculas de ATP y dos moléculas de lactato²⁶, un proceso energéticamente menos eficaz.

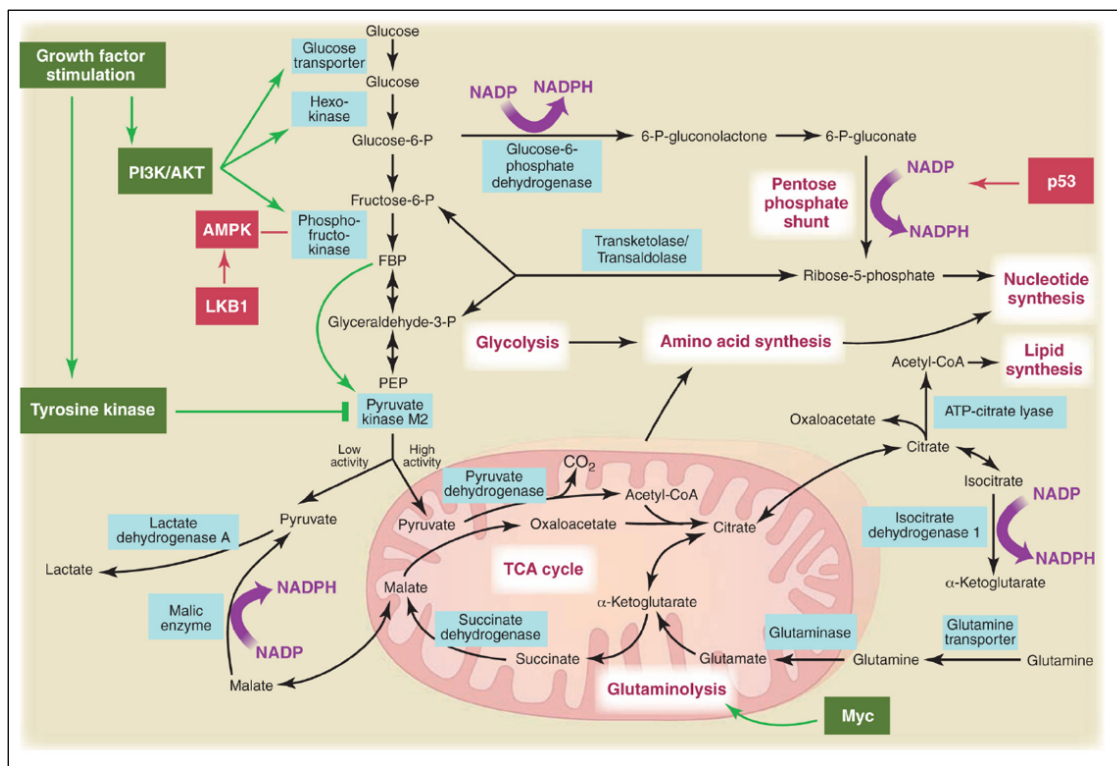


Figura 5. Producción metabólica de nucleótidos, proteínas y lípidos, esenciales para el anabolismo en células tumorales glias. Efectos de los diversos genes estimuladores (fondo verde) y supresores (fondo rojo).²⁶

En cambio, las células cancerígenas experimentan el conocido “efecto Warburg”³⁴, que consiste en la capacidad de realizar la glicolisis aerobia y anaerobia simultáneamente, generando así grandes cantidades de lactato, incluso en presencia de oxígeno. Esto se debe, muy probablemente, a que estas células necesitan además de ATP, y para reproducirse rápidamente, grandes cantidades de precursores metabólicos como acetyl-coenzima A para sintetizar ácidos grasos, intermediarios para sintetizar aminoácidos no esenciales, ribosa

para generar nucleótidos y equivalentes de reducción para combatir el estrés oxidativo, durante los múltiples procesos anabólicos característicos de las células tumorales³³.

En el segundo paso de la glucólisis, la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato mediante la acción de las hexoquinas I-IV, y convertida posteriormente en fructosa-6-fosfato por la fosfoglucoisomerasa. Los factores de crecimiento activan vías de señalización que regulan la actividad de la enzima piruvato quinasa, facilitando el redireccionamiento de los metabolitos de glucosa a la vía de la pentosa fosfato, una ruta metabólica fundamental para la biosíntesis de nucleótidos y aminoácidos y para la generación de equivalentes de reducción NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reducido) para combatir el estrés oxidativo²³.

La ruta de las pentosa fosfatos³⁵ implica dos segmentos:

- El segmento oxidativo, que utiliza G6P y genera equivalentes de reducción. En esta fase participan enzimas como la glucosa 6-fosfato (G6PDH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), que generan dos equivalentes de reducción NADPH y ribulosa 5-fosfato necesaria para la síntesis de nucleótidos.
- El segmento no oxidativo, con la participación de las enzimas transaldolasa y transketolasa que reorganizan el esqueleto carbonado de la G6P, para producir finalmente ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos.

La conversión de glucosa y glutamina a lactato, mediante la lactato deshidrogenasa y la glutaminasa (GLS), también genera NADPH, acetil-coenzima A y eventualmente ácidos grasos, necesarios para la sostener la producción de membranas necesaria para la proliferación celular. Por un lado, la glucosa se convierte inicialmente en acetil-coenzima A en la mitocondria y sintetiza citrato en el ciclo tricarboxílico, que es extruido al citosol para la síntesis de lípidos, mediada por la enzima ATP-citrato liasa. Por otro, la glutamina también puede proporcionar el citrato necesario para la producción de lípidos, mediante el proceso conocido como “carboxilación reductiva”, un proceso encontrado en varios tumores y también en gliomas³⁶. En este proceso, la glutamina es hidrolizada a glutamato, mediante la glutaminasa, y éste a α -

ketoglutarato, que es posteriormente carboxilado reductivamente a citrato, que puede ser también extruido al citosol y generar acetil-coenzima A citosólico para producir finalmente ácidos grasos.

Notablemente, la evidencia acumulada sugiere que inhibir farmacológicamente los enzimas relacionados en la síntesis de ácidos grasos y lípidos, inhibe el crecimiento tumoral³⁷, y particularmente, la inhibición de la ATP citrato liasa disminuye también el crecimiento tumoral.

1.5. Metabolómica de gliomas mediante Resonancia Magnética

1.5.1. Imagen y espectroscopía por Resonancia Magnética

En 1952, Félix Bloch y Edward Purcell recibieron el premio Nobel de Física por la descripción del fenómeno de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Este se basa en las propiedades magnéticas intrínsecas de los núcleos atómicos y su interacción con campos magnéticos externos (Figura 6)³⁸. En ausencia de campo magnético externo ($B_0=0$), los núcleos “precesan” (como peonzas) en todas direcciones y sus momentos magnéticos se cancelan, produciendo una resultante nula. Sin embargo, en presencia de un campo magnético estático externo ($B_0>0$), los núcleos se comportan como pequeños imanes, orientando el momento magnético nuclear resultante principalmente a favor del campo. En términos de mecánica cuántica, se produce entonces un desdoblamiento en dos (o más) niveles de energía, y una distribución estadística de Boltzman de los núcleos involucrados entre ambos niveles. En esta situación de equilibrio magnético, existe un pequeño exceso de núcleos en el nivel inferior (α), que ocasiona que la muestra mantenga una magnetización neta en la dirección del campo magnético externo. La separación entre los niveles de energía (ΔE) nuclear ocurre en la región de radiofrecuencia (RF), por lo que es posible inducir transiciones entre el nivel inferior y el superior, mediante la aplicación de pulsos de radiofrecuencia ($h\nu$, Eq.1).

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad [1]$$

La separación entre los niveles de energía nuclear es una propiedad intrínseca de cada núcleo, que depende su “relación giromagnética” γ , lo que hace que los diferentes núcleos resuenen a frecuencias diferentes, y

características, incluso cuando están expuestos al mismo campo magnético (Eq. 2).

$$h \cdot \nu = \gamma \cdot B_0 \quad [2]$$

Así es posible, con el mismo campo magnético B_0 y la misma instrumentación, detectar las resonancias de diversos núcleos, modificando simplemente la frecuencia de excitación ν (Eq. 2). Los núcleos más importantes en RMN biomédica son el ^1H , el ^{31}P y el ^{13}C , con relaciones giromagnéticas de 267,52; 67,28; y 108,29 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$, respectivamente. Sus diferentes valores de γ , hace que resuenen a frecuencias de, aproximadamente 500, 100, y 132 MHz, respectivamente, cuando están expuestos a un campo magnético estático B_0 de 11,7 Teslas.

El pulso RF transitorio aplicado (normalmente con duración de μs a ms), “promociona” o “excita”, núcleos del nivel inferior (α) al superior (β), alterando así el equilibrio Boltzman inicial. Esta redistribución ocasiona que el momento magnético de la muestra se incline respecto de la magnetización original, de una manera que depende de la duración y potencia del pulso RF aplicado.

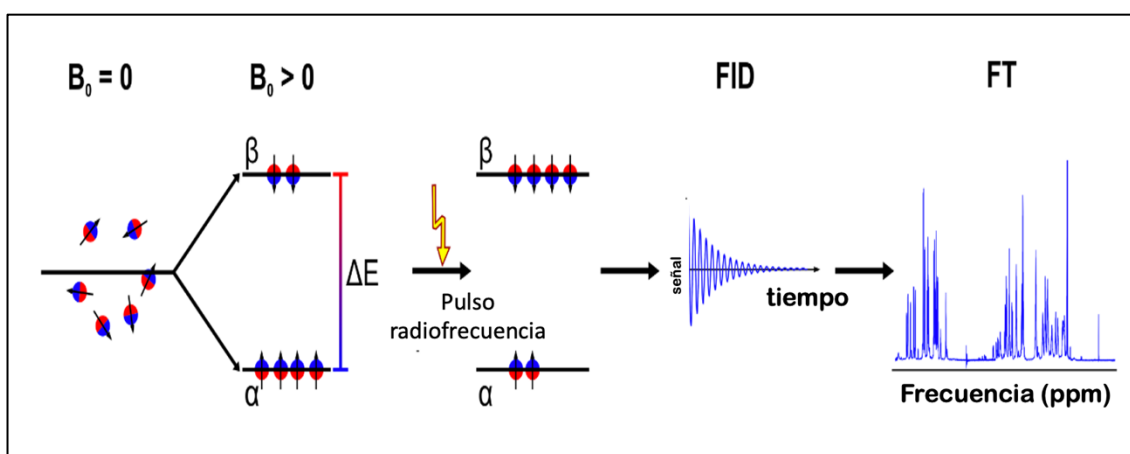


Figura 6. El fenómeno de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la obtención de espectros.

La redistribución alcanzada después del pulso es inestable termodinámicamente, por lo que al discontinuar éste, los núcleos tienden a “relajarse”, emitiendo la RF absorbida y volviendo el vector de magnetización a su posición inicial de equilibrio Boltzman. El movimiento del vector magnetización

hacia el equilibrio, es capaz de inducir una pequeña corriente eléctrica de intensidad decreciente en el tiempo (Free Induction Decay, FID) en una bobina enrollada alrededor de la muestra. Una vez amplificada y digitalizada, esta señal en el dominio del tiempo, puede ser transformada en una señal en el dominio de la frecuencia, mediante una sencilla transformación de Fourier, produciendo el espectro de RMN.

El proceso de relajación magnética, o pérdida de magnetización, es el proceso molecular mediante el cual, los núcleos excitados (nivel β), pierden su energía volviendo eventualmente a su estado fundamental (nivel α). Este proceso se caracteriza por los tiempos de relajación exponencial longitudinal T_1 (pérdida de magnetización en la dirección del campo magnético externo), y transversal T_2 (pérdida de magnetización en el plano perpendicular al campo magnético externo). Brevemente, los tiempos de relajación T_1 y T_2 definen dos mecanismos de relajación magnética diferente; la pérdida de magnetización por su cesión al entorno o "red" (tiempo de relajación spin-red T_1), y la pérdida de magnetización por su cesión a otros núcleos vecinos (tiempo de relajación spin-spin T_2). Ambos tiempos de relajación dependen de la movilidad de los núcleos en el campo magnético y contienen, por tanto, un elevado grado de información sobre su dinámica molecular.

No todos los núcleos de un metabolito o molécula absorben o emiten energía con la misma frecuencia. Este fenómeno se conoce como "desplazamiento químico"(d) y se mide en partes por millón (ppm) con respecto a una referencia interna o externa^{39,40}. De hecho, los electrones que rodean al núcleo, por estar cargados negativamente y en presencia de un campo magnético estático externo B_0 , inducen un campo magnético local opuesto al que experimenta el núcleo, cargado positivamente. De esta manera el campo magnético eficaz (B_{eff}), experimentado por el núcleo, es la diferencia entre el campo magnético aplicado (B_0) y su "apantallamiento electrónico" característico ($B_{apantallamiento}$)

$$B_{ef}=B_0-B_{apantallamiento} \quad [3]$$

Así, el diferente apantallamiento hace que, por ej., los protones del grupo metilo del lactato (H3), resuenen a una frecuencia superior a la de su protón metileno (H2), unido a un grupo hidroxilo. Así mismo, los protones del grupo

metilo de la Alanina, o del ácido N-acetil-aspartico, resuenan a una frecuencia aún inferior, presentando desplazamiento químicos (δ) inferiores⁴¹. En general, el diferente desplazamiento químico de los diferentes grupos funcionales de un metabolito, es una característica que permite identificar sin ambigüedad. el metabolito del que procede.

Además del desplazamiento químico, existen otros fenómenos que influyen en la estructura de las señales RMN. En particular cabe mencionar el “acoplamiento nuclear”, por el que la estructura y multiplicidad de una señal RMN, se ve influenciada por el magnetismo inducido de los núcleos vecinos⁴⁰.

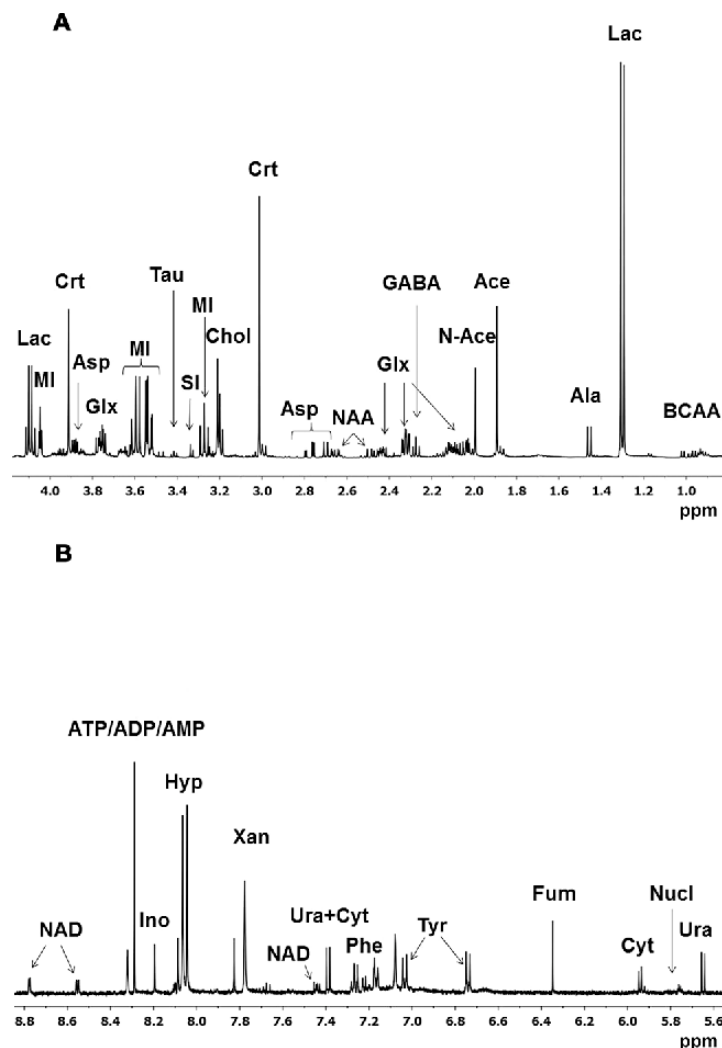


Figura 7. Espectro representativo de alta resolución ¹H RMN (pH 7.2, 22°C, 500 MHz) obtenido de un extracto de metabolitos solubles en ácido procedente de un cerebro de rata adulta.

Así, dos protones próximos en el espacio, no solo experimentan la influencia del campo magnético externo y de sus entornos electrónicos, sino que

sufren además la influencia respectiva de sus respectivos campos magnéticos locales. Esto hace que sus señales se desdoblen en “dobletes”, “tripletes” o “multipletes”, dependiendo del número y distancia entre los núcleos vecinos.

La Figura 7 muestra un espectro de ^1H RMN representativo de un extracto de cerebro de rata con las asignaciones de las resonancias observadas.

La técnica RMN permite además obtener imágenes de la distribución de los núcleos en el espacio. Brevemente, la RMN localiza las coordenadas x, y y z de cada componente de la imagen, variando su frecuencia o su fase, empleando para ello, tres gradientes magnéticos ortogonales x, y, z, que se conocen como gradientes de “sección”, de “lectura” y de “fase” (Figura 8). Estos gradientes se forman en tres bobinas ortogonales, que definen los tres ejes, x, y, z en el objeto de la imagen, o el paciente.

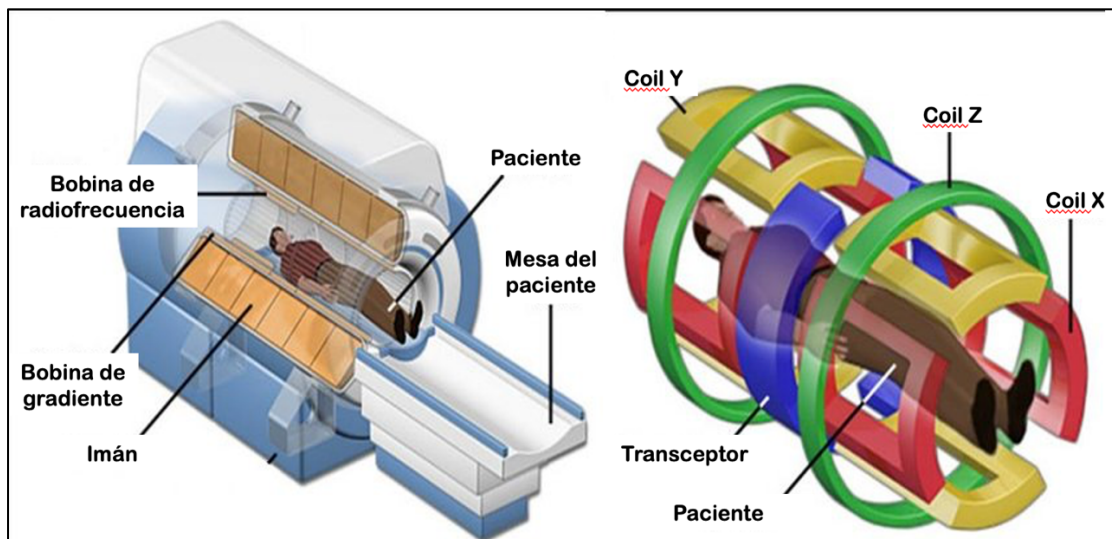


Figura 8. Gradientes magnéticos necesarios para la formación de imágenes de RMN.

La secuencia más utilizada en MRI clínica es la de eco de espín (Figura 9). Brevemente, esta secuencia selecciona un plano z del paciente mediante un pulso RF de 90° en presencia del gradiente de sección. Adquiere un eco después un tiempo (denominado TE), y resuelve la señal del eco adquirido en sus componentes en x e y, utilizando el mismo gradiente de sección (z) y lectura (en x), y múltiples incrementos en el gradiente de fase (en y), respectivamente (Figura 9A). El resultado es una imagen con excelente resolución espacial (Figura 9B), determinada por el número de cambios en el gradiente de fase, que determinan la resolución en los ejes x e y de la sección explorada. Normalmente es posible alcanzar rutinariamente una resolución espacial de $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$. Las

imágenes de eco de espín permiten identificar fácilmente la anatomía cerebral normal, y las lesiones, como en el caso del glioma multicéntrico de la Figura 9B.

Es posible manipular el contraste intrínseco en las imágenes de eco de espín, variando los parámetros de adquisición tiempo de relajación (TR) y TE. Así, es posible adquirir imágenes ponderadas en densidad protónica, con valores de TR muy superiores al promedio de los tiempos de relajación T_1 y valores de TE mucho más cortos que el promedio de T_2 de la muestra. Análogamente, se puede ponderar en T_1 utilizando valores de TR similares o inferiores al T_1 y de TE mucho más cortos que el T_2 , o ponderar en T_2 , mediante valores de TR más largos que el T_1 de la muestra y valores de TE inferiores o en el rango del T_2 .

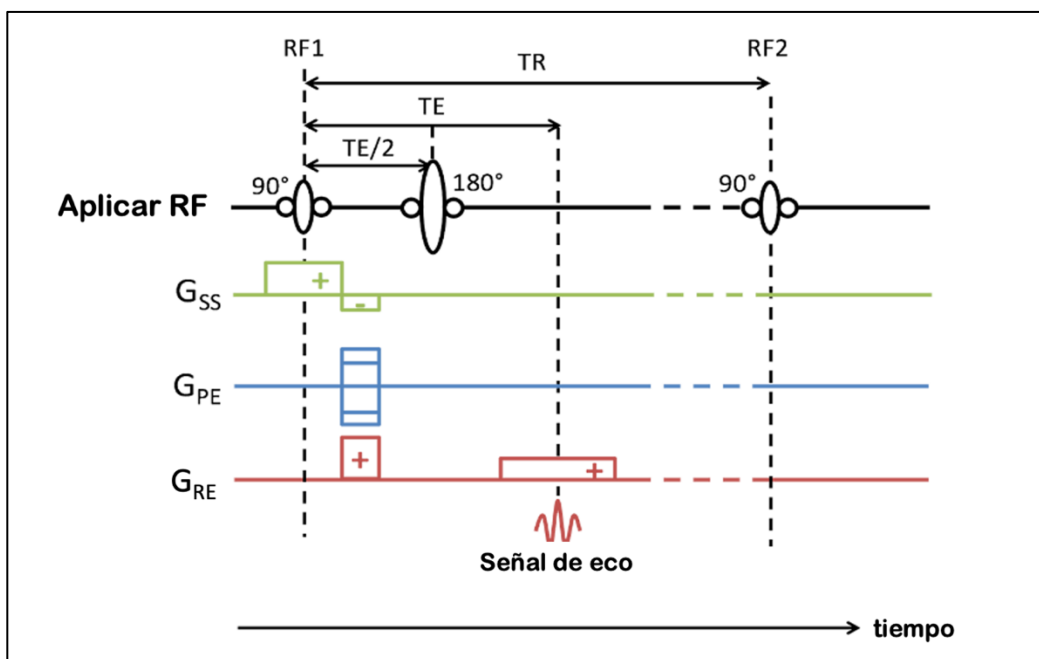


Figura 9. A: Secuencia eco de espín. RF; excitación con pulsos selectivos de 90° y 180°. TR: tiempo de repetición, TE: tiempo de eco, G_{SS}: gradiente de sección, G_{PE} gradiente de fase, G_{RE}: gradiente de lectura.

También es posible inducir contraste extrínseco en las imágenes RM, administrando agentes de contraste. Estos son moléculas de síntesis que modifican los tiempos de relajación de los tejidos en que se acumulan. Pueden ser agentes paramagnéticos, que reducen el T_1 , o superparamagnéticos, que reducen el T_2 , de las regiones en que se localizan. Los agentes paramagnéticos son habitualmente complejos muy estables de Gadolinio (Gd) que inducen un contraste positivo haciendo brillar las regiones en que se acumulan. Los agentes superparamagnéticos suelen basarse en nanopartículas de óxidos de hierro Fe_2O_3 , o magnetita Fe_3O_4 , que inducen un contraste negativo y oscurecen la

señal de las regiones donde se localizan. Ambos tipos de agente de contraste no pasan la barrera hematoencefálica (BHE), pero se acumulan en las regiones periféricas de los gliomas cuya barrera BHE es defectuosa, delimitando así la periferia de la lesión. Normalmente, el halo inflamatorio en las imágenes de glioma es más amplio que las regiones resaltadas por los agentes de Gd, indicando que es posible distinguir las diferentes regiones (o compartimentos) de la lesión tumoral combinando métodos de contraste intrínseco y extrínseco.

Además de los procedimientos de contraste estructural mencionados, es posible ponderar las imágenes de resonancia magnética en variables que revelan la funcionalidad cerebral, como los niveles de oxigenación (BOLD)⁴² que revelan el consumo de oxígeno, la difusión traslacional del agua en cualquier dirección del espacio (ADC)⁴³ y el tensor de difusión (DTI)⁴⁴ que revela la microestructura cerebral y conectividad neuronal, y la transferencia de magnetización, que revela la proporción y dinámica de intercambio de las moléculas de agua entre las fases “libres” del solvente y las “ligadas”, debidas a la solvatación de biomoléculas.

La Resonancia Magnética permite además adquirir espectros localizados *in vivo* de regiones específicas de una muestra, combinando los procedimientos de selección de volumen mediante gradientes ortogonales y la excitación mediante secuencias de eco de espín⁴⁵. Los métodos de espectroscopía de resonancia magnética *in vivo* (ERM) pueden adquirir espectros monovoxel de una región seleccionada⁴⁶, o multivoxel⁴⁷ en la resonancia magnética espectroscópica (MRSI, del inglés magnetic resonance spectroscopic imaging), obteniendo simultáneamente espectros de varios voxeles contiguos (Figura 10).

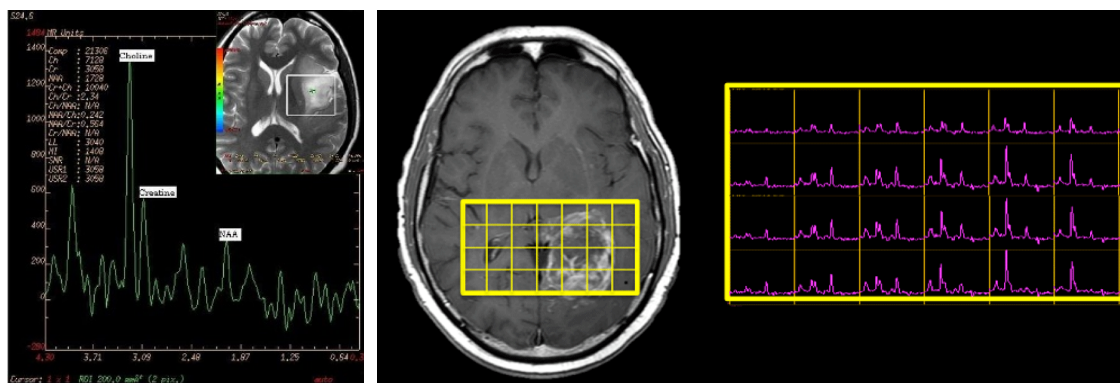


Figura 10. Espectros monovoxel y multivoxel de gliomas cerebrales.
 A: Espectro monovoxel representativo de un glioma. B: Espectro multivoxel representativo de un glioma.

Sin embargo, la resolución de los espectros *in vivo* es muy inferior a la alcanzada con la espectroscopía de alta resolución en extractos y tan sólo resulta posible resolver escasas señales como las del N-acetil-aspártico (2,05 ppm, NAA), la Creatina total y (3,02 ppm, Creatina + fosfocreatina, Cr+PCr) y la Colina total (3,2 ppm, Colina+Fosforil-colina+glicerol-fosforil-colina, Cho+PC+GPC). Aun así, la ERM ha resultado de gran ayuda en la clasificación de gliomas *in vivo*⁴⁸.

Por último, es posible incrementar la resolución de la ERM, utilizando los nuevos abordajes de la espectroscopía en el ángulo mágico (HRMAS, del inglés High Resolution Magic Angle Spinning) (Figura 11). Este abordaje utiliza biopsias de tejido y permite adquirir espectros con resolución similar a la alcanzada en alta resolución, inclinando la muestra en el ángulo mágico ($\alpha=54,7^\circ$) respecto al campo magnético estático (B_0), y rotándola a alta velocidad (4000 rpm) a baja temperatura (4 °C). En este abordaje, se requiere tan solo una pequeña cantidad de muestra (5-20 mg), que se coloca en un pequeño rotor de zirconio con la capacidad requerida (Figura 11A, inserto Fig 11B).

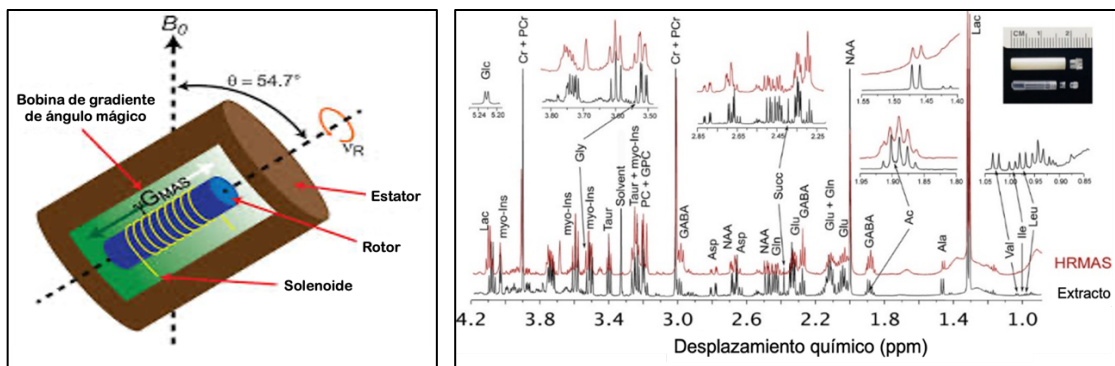


Figura 11. Espectroscopía RMN con giro en el ángulo mágico (HRMAS). A. Rotor HRMAS, B: Espectro de alta resolución de un extracto representativo de tejido cerebral (línea negra) y espectro HRMAS de la biopsia original (línea roja). Inserto: Tamaño de los rotores HRMAS.

En la configuración HRMAS es posible adquirir espectros en la modalidad simple de pulso-adquisición, o “filtrarlos”, utilizando la secuencia Carr-Pucell-Meibom-Gill que disminuye notablemente la contribución de los componentes macromoleculares, como lípidos y proteínas. La Figura 11B muestra una comparación entre los espectros de ^1H RMN (en negro) y ^1H HRMAS (en rojo) de un extracto de cerebro de rata y de una biopsia de su región cortical.

El incremento de resolución HRMAS se debe a que la inclinación y el giro de la muestra anulan los acoplamientos dipolares que ensanchan naturalmente las resonancias observadas *in vivo*, produciendo espectros muy similares a los que se obtienen en alta resolución. De hecho, las resonancias HRMAS, permiten detectar una veintena de metabolitos en los espectros de cerebro y de sus lesiones.

La intensidad de cada una de sus resonancias, representa la concentración del metabolito original, determinada por el balance entre los procesos que lo producen y los que lo degradan. Cada metabolito se convierte así en un indicador de la actividad metabólica de los procesos involucrados en su síntesis y degradación. Dada la gran cantidad de metabolitos detectada, los espectros ^1H HRMAS contienen información una información, comprensiva y simultánea, sobre una gran variedad de procesos metabólicos fundamentales, que pueden contribuir información acerca de sus alteraciones en múltiples procesos fisiopatológicos, incluyendo el cáncer.

Más aún, la resolución puede incrementarse aún más, utilizando abordajes 2D en espectroscopía de correlación (COSY, del inglés correlation spectroscopy), o multinucleares HMQC (del inglés heteronuclear multiple quantum coherence), entre otros⁴⁹, que permite adquisiciones de núcleos poco favorables como el ^{13}C . Esta técnica presenta la ventaja de mantener la microestructura tisular, y la desventaja de requerir la utilización de biopsias de tejido, por lo que solo resulta aplicable en muestras de tejido obtenidas quirúrgicamente.

Una vez adquiridos, los FID ^1H HRMAS se pueden procesar automáticamente utilizando el programa de combinación lineal de modelos de espectros (LC Model, del inglés Linear Combination of Model spectra), que permite cuantificar los diversos metabolitos detectados, como una combinación lineal de metabolitos cerebrales⁵⁰, bien absolutamente, o utilizando la concentración de creatina cerebral (10 mM) como referencia. Los resultados se pueden agrupar u utilizar procedimientos de análisis estadístico multivariante para seleccionar los metabolitos que mejor discriminan entre diversos tipos de patologías⁵¹.

1.5.2. Metabolómica

Las herramientas de ^1H RMN en extractos de tejido y ^1H HRMAS en biopsias, permiten determinar el perfil metabólico, o “huella dactilar”, de los tejidos normales y patológicos, con especial relevancia a los tejidos tumorales, proporcionando concomitantemente información sobre la plétora de los procesos metabólicos que subyacen a los cambios observados^{51,52,53}. La sección 1.2. ha mencionado en detalle que los gliomas se desarrollan acumulando una serie de mutaciones genéticas que terminan por determinar su diagnóstico y pronóstico. Resulta interesante pensar entonces, que las mutaciones genéticas, pueden reflejarse directamente en el perfil metabólico resultante, permitiendo inferir las primeras a partir del segundo. Esta Tesis abordará este objetivo.

Roda y cols.⁵¹ proporcionaron, ya en el año 2000, una de las primeras evidencias en este sentido.

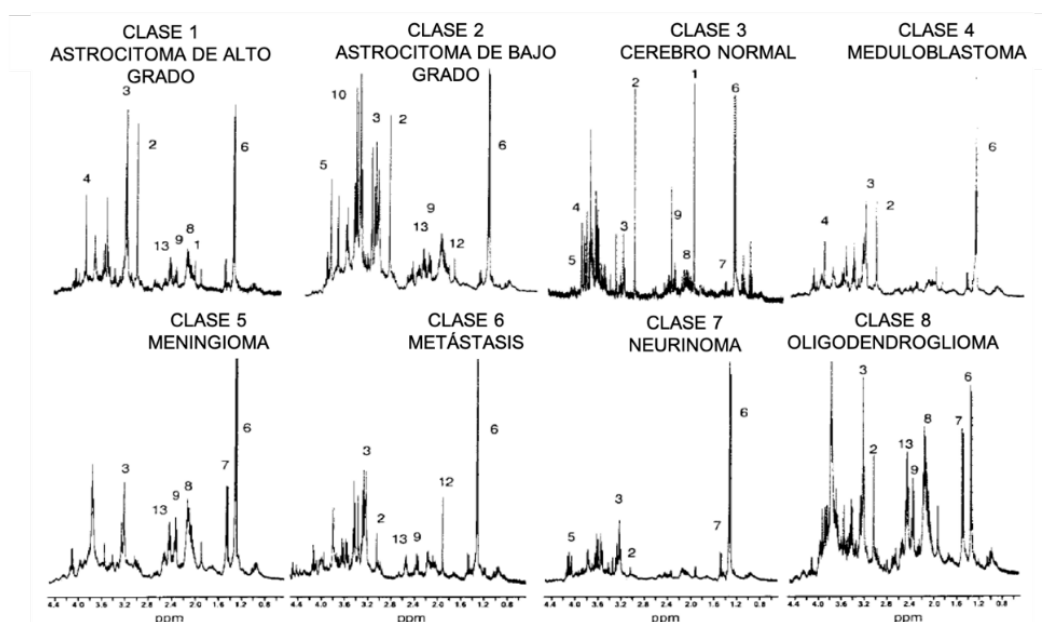


Figura 12. Espectros de ^1H RMN (360,13 MHz, 22°C, pH 7.2) de extractos de metabolitos polares de biopsias quirúrgicas de diversos tumores cerebrales. 1: NAA, 2: Creatina CH₃, 3: Colina, 4: Creatina CH₂, 5: , 6: Lactato CH₃, 7: Alanina CH₃, 8: Glutámico H₃, 9: Glutamina H₃, 10: Taurina H₂, 11: Glicina H₂, 12: Acetato H₂, 13: Glutámico H₄.

Prepararon una colección de 110 biopsias de tumores cerebrales incluyendo gliomas de alto grado (n=19), bajo grado (n=10), meningiomas (n=18), oligodendrogliomas (n=4), meduloblastomas (n=4), neurinomas (n=9), metástasis (n=8), y cerebro normal (n=9), y obtuvieron sus espectros de alta

resolución ^1H RMN de sus extractos y los correlacionaron con su correspondiente análisis histopatológico (Figura 12).

Estos autores, implementaron un algoritmo de análisis multivariante basado en el análisis discriminante lineal que permitió identificar el tipo y grado histopatológico de los diversos tumores cerebrales, a partir de su espectro ^1H RMN, con porcentaje de aciertos y una discriminación considerables. Su abordaje consiguió clasificar correctamente el 100% de las muestras de cerebro normal, el 70% de los gliomas de bajo grado, el 79% de los gliomas de alto grado, el 75% de los meduloblastomas, el 89% de los meningiomas, el 75% de los oligodendrogliomas, el 71% de las metástasis y el 89% de los neurinomas. Solivera et al.⁵² completaron estos resultados con el análisis mediante ^{31}P RMN de los fosfolípidos de membrana tumorales, confirmando la validez del abordaje.

Tomados en conjunto, estos resultados junto con otros derivados de espectroscopia *in vivo*^{54,55} e *in vitro*⁵¹ demostraban una alta correlación entre el perfil metabólico determinado por ^1H RMN y el diagnóstico histopatológico, sugiriendo a la vez una relación importante entre el perfil metabólico observado y la expresión génica subyacente, y apoyando un desarrollo posterior de esta metodología.

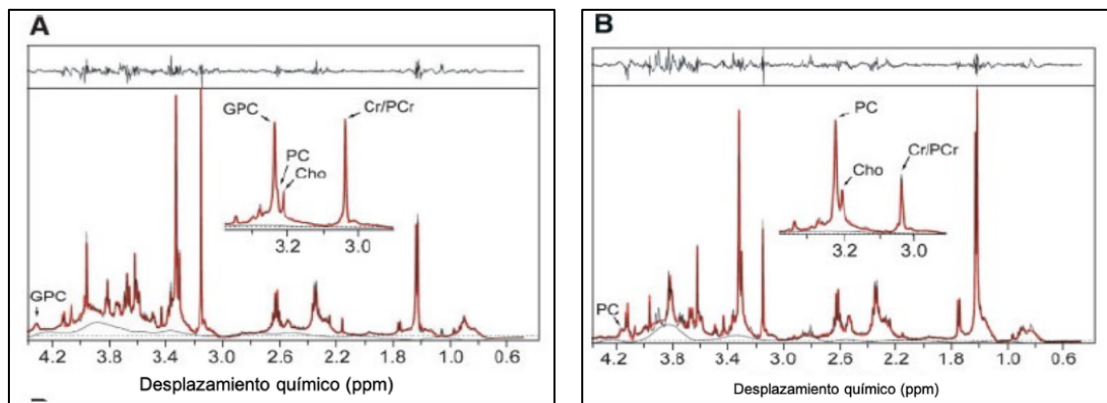


Figura 13. Espectros de ^1H HRMAS en muestras representativas de biopsias de glioma de bajo grado (A) y alto grado (B). Espectro experimental (negro). Espectro simulado LC Model (en rojo) Inserto superior: Diferencia entre los espectros experimental y simulado.

Finalmente, Righi y cols.⁵⁶ utilizaron ^1H HRMAS para mejorar la discriminación entre gliomas de alto y bajo grado, determinado su perfil metabólico y la expresión de los genes de la ruta Kennedy del metabolismo de fosfolípidos (Figura 13). Su trabajo demostró que los gliomas de bajo grado

mostraban un contenido de GPC superior al de PC, mientras que los de alto grado mostraban la situación inversa, consiguiendo discriminaciones muy satisfactorias entre ambos grados y demostrando que estas relaciones estaban directamente relacionadas con la expresión de los genes de la ruta de Kennedy. Estudios posteriores, empleando ^{13}C HRMAS y expresión de genes del metabolismo energético y de hipoxia, permitieron detectar la transición espacial desde el metabolismo energético normal, en la zona contralateral, al metabolismo tumoral en gliomas C6 implantados en cerebro de rata, demostrando que la reprogramación metabólica y genética eran simultáneamente detectables mediante HRMAS⁵⁷.

1.6. Criterios de supervivencia

Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora no permitían realizar estimaciones de supervivencia en los pacientes de glioma de alto y bajo grado. Esta tesis aborda este aspecto con una nueva base de datos que correlaciona la supervivencia, los espectros de alta resolución ^1H RMN y ^1H HRMAS de las biopsias y el perfil genético de las mismas.

La relación entre el perfil histológico y molecular de los gliomas cerebrales, ambos recogidos en la última clasificación de la WHO, y la supervivencia de los pacientes es bien conocida.^{58,59} En base a esa predicción se decide el algoritmo terapéutico más adecuado para cada paciente, en general mediante un estudio individualizado del paciente y la valoración multidisciplinar en un comité de neurooncología. Sin embargo, la capacidad predictiva del perfil metabólico en los gliomas cerebrales ha sido poco estudiada. En nuestra reciente publicación⁶⁰, revisamos la literatura y recogimos todos los artículos en los que se había estudiado el impacto del perfil metabólico en el pronóstico del paciente. La mayoría de publicaciones previas recogían sólo tumores de alto grado y cuando incluyen los gliomas de bajo grado su tiempo de seguimiento resultaba demasiado corto. En muy pocos casos se empleaba espectroscopía de alta resolución ^1H -MR *in vitro*, con lo que muchos metabolitos observables tan solo mediante AR-ERM ^1H no eran considerados en el análisis.

Hattingen et al.⁶¹ consiguieron un tiempo de seguimiento medio de 37 meses en gliomas de bajo grado, representando el seguimiento más largo reportado y describieron el aumento del *myo*-inositol (MI) en procesos gliales, sin

encontrar diferencia entre los diferentes grados histopatológicos de glioma. Chang et al.⁶² publicaron la serie más larga, con 143 pacientes con gliomas tanto de alto como de bajo grado, estudiados mediante ERM *in vivo*. Describieron el aumento de Cho y lípidos y la disminución de NAA en los tumores más agresivos, así como el bajo ADC. En esta Tesis se proporcionarán nuevas evidencias sobre la capacidad predictiva de supervivencia global, en base a los espectros de AR-ERM ¹H.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis es contribuir nuevas herramientas de resonancia magnética que puedan mejorar el diagnóstico y pronóstico de los gliomas cerebrales humanos utilizando espectroscopia de Resonancia Magnética y análisis genéticos complementarios. Más concretamente hemos abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Crear un biobanco de muestras de glioma cerebral humano y una base de datos de los pacientes incluidos junto con los resultados obtenidos del análisis espectroscópico y genómico de dichas muestras. Proponemos generar un biobanco multicéntrico de muestras de glioma cerebral humano, que nos permita conservar biopsias obtenidas de la zona más agresiva del tumor de forma que podamos disponer de ellas, no sólo para el estudio actual, sino también para futuros análisis. Proponemos generar así, una nueva base de datos de pacientes con glioma cerebral incluyendo información retrospectiva, con los datos acumulados previamente en nuestro Servicio, y otra prospectiva, generada a partir de 2015 con metodologías más avanzadas. Existen muy pocas bases de datos en el mundo que recojan toda la información demográfica y clínica de estos pacientes asociada a análisis de tipo histológico, metabolómico y genético. Nuestro objetivo es proporcionar bases de datos homogéneas que recopilen toda esta información.

2. Evaluar criterios de supervivencia postquirúrgica en las bases de datos retrospectiva y prospectiva. Las predicciones pronósticas de estos pacientes se han basado en la anatomía patológica del tumor y determinan la decisión del protocolo terapéutico individual para cada paciente. Estas predicciones agrupan a los pacientes en grupos grandes donde existe amplia variabilidad entre ellos, especialmente en los pacientes que sufren gliomas de grados menos agresivos. Pretendemos obtener nuevos criterios estadísticos que puedan complementar los actuales criterios pronósticos anatomopatológicos. De manera que se podrán establecer predicciones más precisas e individualizadas basadas, no sólo en la anatomía patológica del tumor que ha demostrado ser en ocasiones poco reproducible, sino también en su perfil metabolómico y genético. Este abordaje

podría resultar aún más útil, en aquellos grupos de pacientes con gliomas de bajo grado y larga supervivencia, cuyo comportamiento expresa una gran variabilidad.

3. Evaluar el perfil genético y metabolómico de cada biopsia, establecer la correlación entre los mismos, y determinar su patrón de interacciones. El comportamiento “dinámico” del tumor viene determinado por sus diversas alteraciones genéticas y su expresión a nivel metabolómico. Proponemos aplicar un abordaje interactómico para conocer las asociaciones existentes entre cada alteración genética y su firma metabolómica, que se traducen, en definitiva, en el comportamiento más o menos agresivo del tumor y por lo tanto en el pronóstico del paciente, con el fin de identificar potenciales futuros biomarcadores relevantes para el pronóstico o que puedan servir como dianas terapéuticas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Generación de bases de datos y creación de un biobanco de muestras de gliomas cerebrales.

El presente estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz y se llevó a cabo según sus recomendaciones. Todos los sujetos dieron por escrito su consentimiento informado de conformidad con la Declaración de Helsinki. Además, obtuvieron los consentimientos informados correspondientes para el procedimiento quirúrgico, para el estudio y el correspondientes para el almacenamiento en Biobanco.

Hemos generado dos bases de datos; una para el análisis retrospectivo de pacientes que fueron intervenidos en el periodo 1992-1998 en el Departamento de Neurocirugía del Hospital Universitario La Paz, que incluye 66 pacientes tratados consecutivamente de glioma (grados I-IV), y otra para el estudio prospectivo de 100 pacientes cuyos datos provienen de dos Hospitales: el Hospital Universitario La Paz (Madrid), en el periodo 2015-2019, y el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba), en el periodo en 2015-2020.

Ambas bases se han realizado siguiendo el mismo protocolo, reuniendo en cada paciente; (i) los datos demográficos, clínicos, radiológicos, (ii) sus características histopatológicas y genéticas y (iii) sus características espectroscópicas obtenidas mediante AR-ERM ^1H *in vitro* en los pacientes del estudio retrospectivo y por ^1H y ^{31}P HRMAS en el estudio prospectivo.

Las características radiológicas del tumor han sido evaluadas por dos radiólogos independientes y clasificadas según tamaño, localización y elocuencia⁶³. En el estudio prospectivo se incluyen, además, aquellos datos de imagen avanzada de los que se dispone más recientemente, incluyendo perfusión, difusión y espectroscopía RMN multivoxel (MRSI) de ^1H a 3 Teslas.

La clasificación histopatológica de las biopsias ha sido proporcionada por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital que analizó las muestras siguiendo los estándares de la clasificación actual en cada momento, en el caso del estudio retrospectivo la clasificación WHO de 2007⁷ y en el caso del estudio prospectivo siguiendo la última clasificación WHO de 2016⁸. En la base de datos

prospectiva los gliomas grado I no fueron incluidos por sus diferencias fisiopatológicas con el resto de gliomas bien reportadas^{64,65}.

Se ha recopilado también la información sobre la evolución postquirúrgica de estos pacientes, incluyendo síntomas clínicos relevantes, terapias adyuvantes y tiempo de supervivencia global (SG). En la serie de pacientes de la base de datos prospectiva se ha realizado también un análisis genético de las mutaciones más relevantes, que podrían estar relacionadas con el perfil metabólico y comportamiento del tumor, y por tanto también con el pronóstico del paciente y su SG.

Tomados en conjunto, ambos estudios generaron un nuevo biobanco de biopsias de gliomas cerebrales, en el que todas las biopsias se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento quirúrgico. Más concretamente, se evitó el uso de la coagulación bipolar y se seleccionaron aquellas partes del tumor más agresivas, dividiéndolas rápidamente tras su aislamiento, en varias porciones similares adyacentes, conservándolas inmediatamente en nitrógeno líquido (-169°C) primero, hasta su almacenaje a -82°C en un congelador *ad hoc* del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC/UAM, para su posterior procesamiento y análisis⁵¹. Las muestras del biobanco se codificaron adecuadamente para garantizar (i) el cumplimiento de la ley de protección de datos del paciente y, (ii) permitir asociar los resultados de los análisis de cada muestra a las características individuales de cada paciente.

3.2. Metodología para la obtención de perfiles genéticos y metabólicos.

3.2.1. Estudio retrospectivo

Las biopsias congeladas en N₂ líquido (-195.8 °C), se redujeron a polvo en un mortero previamente enfriado (con metanol/hielo seco), se extrajeron con ácido perclórico al 6% (v/v). Los extractos ácidos se neutralizaron con KOD (pH: 6.5-7.0), se liofilizaron a sequedad y se resuspendieron en 0,6 mL de D₂O (99,9% D), para su análisis mediante AR-ERM ¹H⁵¹.

Los espectros ¹H AR-ERM de extractos de biopsias se adquirieron a 8,4 Teslas (360,13 MHz, pH 7,2, 22°C) en un equipo Bruker AM-360 equipado con una sonda comercial selectiva para ¹H, utilizando tubos RMN de 5 mm y 0,5 ml de muestra. Las condiciones de adquisición fueron: pulsos de 90°, 16,9 s. de tiempo total de ciclo y 16.384 puntos de datos adquiridos en el dominio del tiempo

durante de 1.901 s. La intensidad de la resonancia del agua residual se redujo utilizando un pulso de presaturación de 5 s. centrado en la frecuencia del agua. Antes de la transformación de Fourier, la señal en el dominio del tiempo se llenó de ceros hasta 128K y se multiplicó por una función exponencial, que resultando en un ensanchamiento artificial de la anchura de la resonancia de 0,5Hz en el espectro transformado. El procesamiento espectral adicional, incluyendo las correcciones de fase y de línea de base fueron realizadas por el mismo operador. Los desplazamientos químicos se refieren a la señal de los tres metilos co-resonantes del 2,2'-3,3' tetradeutero-trimetil-silil-propionato sódico (TSP) a 0 ppm, utilizado como referencia interna.

Se identificaron los siguientes metabolitos en el espectro de ^1H AR-ERM (resonancias utilizadas para la cuantificación, número de protones que originan la resonancia utilizada, multiplicidad de la señal)⁶⁶: Valina (Val, 1.09 ppm, 3H, d), Lactato (Lac, 1.35 ppm, 3H, d), Alanina (Ala, 1.45 ppm, 3H, d), Acetato (Ac, 1.93 ppm, 3H, s), ácido N-acetil-aspartico (NAA, 2,01 ppm, 3H, s), ácido Gamma-Amino Butírico (GABA, 2.31 ppm, 2H, t), Glutamato (Glu, 2.43 ppm, 2H, m), Glutamina (Gln, 2.45 ppm, 2H, m), Ácido aspártico (Asp, 2.80 ppm, 2H, dd), Creatina (Cr, 3,05 ppm, 3H, s) y Fosfocreatina (fCr, 3,055 ppm, 3H, s), Colina libre (Cho, 3.20 ppm, 9H, s), Fosforil-colina (PC, 3.22 ppm, 9H, s), Glicerol-fosforil-colina (GPC, 3.25 ppm, 9H, s), Taurina (Tau, 3.45 ppm, 2H, t), glicina (Gly, 3,55 ppm, 2H, s) y *myo*-inositol (MI, 4,07 ppm, 1H, dd).

Para el cálculo de concentración de cada uno de estos metabolitos, se ajustaron las resonancias anteriormente especificadas, a curvas de tipo Lorentz mediante el programa MNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, ES) y la integral resultante dividida por el número total de protones del metabolito correspondiente⁶⁷. Todos los valores obtenidos fueron estandarizados usando la suma de todos los metabolitos medidos en el espectro de ^1H AR-ERM y expresados como porcentaje molar del total^{52,68}. Las asignaciones se realizaron con la ayuda de valores químicos descritos en la literatura^{66,40}, o mediante la adición de los correspondientes metabolitos puros .

3.2.2. Estudio prospectivo

Perfil metabólico

Los espectros HRMAS de protón (^1H) de las biopsias de gliomas se obtuvieron en un sistema Bruker Avance 11,7T, equipado con una consola de radiofrecuencia operando a 500,13 MHz para ^1H y un accesorio HRMAS (Bruker Biospin, Wissembourg, FR), utilizando una sonda triple de HRMAS ^1H , ^{31}P , ^{13}C .

Brevemente, la biopsia (10-15 mg) se colocó en un rotor de zirconio (4 mm de diámetro interno) con 50 μL de capacidad. Se completó la cavidad con D_2O y se transfirió a la sonda de HRMAS pre-enfriada. Los espectros de ^1H HRMAS se adquirieron a 4°C con una velocidad de giro de 5 KHz, empleando secuencias de espín-eco CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) con tiempo de eco de 36 ms, 32K puntos de datos y 128 medidas acumulativas. La señal del agua se suprimió empleando un pulso de presaturación aplicado durante el tiempo de repetición (5s).

Los espectros se procesaron y cuantificaron con el software LC Model⁶⁹, que ajusta el espectro como una combinación lineal de espectros modelo individuales desde una base de datos, desarrollada en el laboratorio, conteniendo todos los metabolitos cerebrales de interés (Tabla 2).

Brevemente, LC Model ajusta el espectro experimental a la combinación lineal de metabolitos de interés, calculando los valores de concentración absoluta y relativa (a Cr) de cada metabolito, así como el porcentaje estimado de desviación estándar entre el espectro experimental y el calculado, expresado como CRLB% (Cramér–Rao-Lower-Bound). La base de datos utilizada incluye, entre otros: Acetato (Ac), Alanina (Ala), Aspártico (Asp), Colina (Cho), Creatina (Cr), Fosfocreatina (PCr), γ -amino-butírico (GABA), glucosa (Glc), Glutamina (Gln), Glutamato (Glu), Glutación reducido (GSH), Glicina (Gly), Glicerol-fosforil-colina (GPC), Leucina (Leu), *myo*-inositol (MI), Lactato (Lac), Isoleucina (Ile), N-acetil-aspártico (NAA), Fosforil-etanolamina (PE), Fosforil-colina (PC), Taurina (Tau), Treonina (Thr), y Valina (Val). Adicionalmente, las resonancias de los grupos metilo (0.9 ppm) y metileno (1.3 ppm) de los ácidos grasos móviles⁷⁰ se ajustaron como señales Lip09 y Lip13 respectivamente. La Tabla 2, recoge las resonancias de los protones de los metabolitos determinados, su desplazamiento químico, y los procesos metabólicos asociados a cada uno de ellos.

Tabla 2. Metabolitos cerebrales más destacados detectados mediante ¹H-
HRMAS (pH 7.0, 4^oC, 4000rpm)

Resonancia	Desplazamiento Químico (ppm) ¹	Proceso metabólico asociado
Lactato H3	1.35	Glucolisis
Lípidos CH3, CH2	0.9, 1.3	Metabolismo lipídico
Alanina H3	1.45,	Metabolismo aminoácidos, Hipoxia
Leucina H5,H6	1.05	Metabolismo aminoácidos
Valina H4,H5	1.15	Metabolismo aminoácidos
Acetato H2	1.90	Ciclo tricarboxílico, Hipoxia, Metabolismo microbiano
N-acetilaspártico H6	2.00	Osmoregulación, Síntesis lípidos, Marcador Neuronal
N-acetilaspárticoglutámico	2,01	
Glutámico H3, H4,H2	2.10, 2.45, 3.80	Metabolismo aminoácidos, Neurotransmisión, Ciclo Tricarboxílico
Glutamina H3,H4, H2	2.05, 2.50, 3.85	Neurotransmisión, Carboxilación oxidativa
GABA H2, H3	1.85, 2.95	Neurotransmisión
Aspártico H2, H3	3.9, 3.65	Metabolismo aminoácidos, Ciclo Tricarboxílico
Glutation reducido GSH H2	2.55	Balance redox
Creatina	3.05	Metabolismo energético
Fosfocreatina	3.06	Metabolismo energético
Colina	3.20	Metabolismo lipídico
Fosforilcolina	3.21	Síntesis fosfolípidos
Glicerolfosforilcolina	3.22	Degradación fosfolípidos
Taurina H2,H3	3.25, 3.38	Osmoregulación
Inositol H2,H1-H3,H4-H6, H5	4.09, 3.55, 3.63, 3.27	Osmoregulación, Marcador glial
Scillo-inositol	3.35	
Fosforiletanolamina	3.98	Síntesis de fosfolípidos
Glucosa H6	5.02	Metabolismo energético

¹ medidos respecto a la Creatina a 3.05 ppm

La cuantificación se llevó a cabo por determinación de la concentración relativa de cada metabolito respecto al contenido total de creatina (Cr+PCr) en la muestra, excluyeron del estudio todos los metabolitos cuyo valor de CRLB fue superior al 20%. Para los análisis interactómicos se calcularon también las concentraciones en forma de porcentaje molar, estandarizando por el total de la suma de los valores absolutos obtenidos como resultado de la cuantificación antes de la obtención de los ratios a creatina total.

Perfil genético

Los perfiles genéticos se realizaron en 41 biopsias y se obtuvieron mediante el uso de kit comerciales AllPrep RNA/DNA/Protein (QIAGEN, Venlo,

NL). Brevemente, se procesaron las muestras para la obtención de sus ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm), determinando los niveles de expresión de los ARNm de transportadores, enzimas y otras proteínas de interés. Adicionalmente, se determinó la expresión genes considerados como marcadores tumorales de agresividad y pronóstico, con el fin de realizar una caracterización más completa de las muestras estudiadas⁷¹. El proceso se llevó a cabo en varios pasos para asegurar la integridad y correcto aislamiento y extracción del ARN y proteínas. La integridad del ARN obtenido de cada muestra se determinó mediante espectrofotometría UV a 260 nm (Nanodrop 200 UV-VIS Spectrophotometer, Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

Con posterioridad a la extracción se llevó a cabo una retrotranscripción de cada muestra de ARNm empleando Kits RevertAid First Stand cDNA Synthesis (MRI Fermentas, Hanover, MD, EEUU), utilizando iniciadores al azar y H₂O, con el objeto de crear una mezcla maestra (Master mix).

Además, se llevó a cabo un estudio de la presencia de mutaciones en los genes IDH1R132H e IDH2R172H en las biopsias. Brevemente, se tomaron las secuencias de ADN de estas dos isoformas disponibles en el GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA National Library of Medicine) y mediante el software Primer3 se seleccionaron las características de los cebadores específicos (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de cebadores de las isoformas IDH1 y IDH2

Gen	Secuencia cebadores	Tamaño (pb)	Nº GenBank
IDH1	Sn: CGGTCTTCAGAGAAGCCATT As:GCAAAATCACATTATTGCCAAC	129	NC_000002.12
IDH2	Sn:CAAGCTGAAGAAGATGTGGAA As: CAGAGACAAGAGGATGGCTA	238	NC_000015.10

También fue necesario el diseño de cebadores específicos para la expresión de los distintos componentes metabólicos relevantes en las células tumorales. Para ello se obtuvieron secuencias codificantes (CDS, del inglés coding sequences) de cada uno de los ARNm del GenBank NCBI). Mediante Primer-Blast se verificó que los cebadores seleccionados eran específicos de cada secuencia, y se encontraban en exones distintos (Tabla 4). Estos cebadores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT), y como

método de validación de los mismos se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Dream Taq DNA Polymerase, ThermoFisher Scientific, Madrid, España). Esta reacción fue llevada a cabo en el termociclador Bio-Rad T100 (BioRad; Hercules; Foster City, CA, EEUU).

Los números de acceso pertenecen a secuencias genéticas de *Homo sapiens* de las variantes amplificadas seleccionadas: sense (Sn), antisense (As), pares de base (pb). A continuación, se purificó el producto obtenido mediante la PCR mediante el kit AccuPrep Gel Purification Kit (K3035, Bioneer, CA, USA9, se cuantificó mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000 y se confirmó que la secuencia obtenida era la esperada realizando una secuenciación Sanger.

Tabla 4. Secuencias de cebadores de cada gen estudiado, tamaño del producto amplificado por PCR en pares de bases y número de acceso de GenBank

Gen	Secuencia cebadores	Tamaño del amplicón (pb)	Nº GenBank
BCAT1	Sn:TTGGAAGTGGAGCCTTCTCTTG As:GACCTGCTGACACCCATTATC	236	NM_001178094.1
CDIPT	Sn: CACGCTGTTCTTCCAAATCA As: ACAGTCCCACAGAGCCAACT	245	NM_006319.5
CHKA	Sn: CGGAAGTATCCCACCAAGAA As: GAGATGCAAGGGCAAACCTA	151	NM_001277.3
CS	Sn: ACTCAGGACGGTTGTTCC As: TAGGCAGGTGTTTCAGAGCA	99	NM_004077.3
ETNK1	Sn: TTCAGGATCAGGAGGAGCA As:TGTGATTCCATCTGTGAAGAGC	116	NM_018638.4
GAD1GAD25	Sn: TATGGGGTTCGCACAGGT As: CTCATGTCTGATGGCATGTTG	122	NM_013445.3
GAD1GAD67	Sn: TGCCTAAACTGGTCTCTTCA As: TTATTTTCCCCCTTTTCATTGC	123	NM_000817.3
GCK	Sn: GGCTTACCTTCTCCTTTCC As:AAGTCCCCTCTCCGTTTGAT	146	NM_001354800.1
GLS	Sn: GGCAGTTTGCTTTCCATGTT As: TTGCCCATCTTATCCAGAGG	121	NM_014905.4
GLUD1	Sn: CTTTATTGGTCCTGGCATTGA As: GATTCCCCCTTGGCTGAT	157	NM_001318905.1
GLUL	Sn: GTGTGGAAGAGTTGCCTGAGT As: CGTTTACAGGTGTGCCTCAA	199	NM_002065.6
GLUT2	Sn: ACCAATTCCAGCTACCGACA As: ATGTTTACAGCGCCAACCTCC	164	J03810.1
GLPD1	Sn: AGCCTGAGCGACAAAGAAAA As: TAGCCATACACCCTCCAAG	218	NM_001503.4
GPT	Sn: CGGAGAGTGGAGTACGCAGT As: TAACACAGAGGGCCAAGACC	181	NM_005309.3
HIF1A	Sn: CAGCAACGACACAGAAACTGA As: AGCGGTGGGTAATGGAGAC	127	NM_001243084.1
HIF2A	Sn: TCGGAGAGGAGGAAGGAGA As:CAGAGCAAAGTGGAGAGGA	193	NM_001430.5
HIF3A	Sn: ATCCACCCCTGTGACCAA As: AGAGCAGTTCAGCACCTTCC	180	NM_152794.3
HIK1	Sn: CCATTGTCTCATTTTCGCTCA As: GGAATACTGTGGGTGCGTCT	146	NM_001322365.1
HK2	Sn:GACGAGAGTTTCTGGTCTCAT As: TCATTCACCACAGCCACAAT	137	NM_000189.4

Tabla 4. Secuencias de cebadores de cada gen estudiado, tamaño del producto amplificado por PCR en pares de bases y número de acceso de GenBank (continuación)

Gen	Secuencia cebadores	Tamaño del amplicón (pb)	Nº GenBank
HK3	Sn: TCATTCACCACAGCCACAAT As: TCTTGGGGGATCACAAACTC	138	NM_002115.3
ISYNA1	Sn: CAACTACTACGGCTCGCTGA As: GTCCCAGCCATCGAACAC	136	NM_016368.4
TP53	Sn: AAGGAAATTTGCGTGTGGAG As: CCAGTGTGATGATGGTGAGG	180	NM_001276760.2
PCa	Sn: CTACGAGGAGCTGGAGGAGA As: GGTGCAGGATGTTCCCATAC	152	NM_001040716.1
PCYT1A	Sn: GATGGGGTTCCTTCCAAAGT As: TCTCACAGGTCGCTCACAAG	153	NM_001312673.2
PDE1A	Sn: AGGGATTGACAGAGCCAAAA As: AAAGTGGGGAAAATGGAAGC	167	NM_001363871.1
PDHA1	Sn: CCGAATGGAGTTGAAAGCAG As: CGGTAGGCTGTGATGAGATG	162	NM_001173455.1
PDHA2	Sn: GAATCAGGGGCAGATAGCC As: TCACGAACACACAGAACATCC	195	NM_005390.4
PDK1	Sn: CCTCTGGCTGGTTTTGGTTA As: CGTGGTTGGTGTGTAATGC	196	NM_001278549.1
PFKM	Sn: GAATGTCCACCAGATGACGA As: ACCCTCAGCCACAATGATGA	102	NM_001166688.1
PKM	Sn: TCCAGGTGAAGCAGAAAGGT As: ACAGCAGGCAAGTCCACAG	115	NM_001206796.3
PLA2G2A	Sn: TTGACGACAGGAAAGGAAGC As: TTGCACAGGTGATTCTGCTC	205	NM_000300.3
PLCG1	Sn: GAGGCACTGGAGAAGATTGG As: GGCTTTGACTGCACACTTGA	120	NM_002660.2
SHMT1	Sn: CCCTACAAGGTGAACCCAGA As: ATCTGCAATCTTCCGTAGCC	147	NM_004169.5
SIRT1	Sn: ACAATTCCAGCCATCTCTCTGT As: CCTGTTCCAGCGTGTCTATGT	101	NM_012238.5
SLC6A1	Sn: ACCACTTTTAGGTCCGGCTCA As: CCTTTTCTGCTCGTTTGCT	161	NM_001166496.1
SLC6A17	Sn: ATGGGGTTGGATTGTGGTT As: GGACCTCCTGCGTACATAACA	171	NM_001270623.2
SMPD1	Sn: TCCGCCTCATCTCTCAAT As: GCACTTTGTCTCCTCGATCC	138	NM_001318088.1
LDHA	Sn: ATTCAGCCCGATTCCGTTA As: TTCCACTCCATACAGGCACA	114	NM_005566.3
LDHB	Sn: AAGTGTGGCTGTGTGGAGTG As: TCATTGTCAGTTCCTTCTG	81	NM_002300.7

Posteriormente, se llevó a cabo la validación de especificidad de los cebadores mediante PCR cuantitativa (qPCR), usando SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent, Madrid, ES) y mediante el termociclador Mx3000P (Stratagene, Madrid, ES), llevando a cabo un proceso de preamplificación tras la retrotranscripción de las muestras, para incrementar el número de copias del ADNc obtenido.

Una vez amplificadas, se realizó un tratamiento de exonucleasa para obtener solo el producto de la preamplificación. Finalmente utilizando un array de qPCR (personalizado y diseñado para este trabajo) en el sistema de Biomark HD (Fluidigm) se pudo estudiar la expresión de los distintos genes seleccionados en este estudio de forma paralela empleando la placa Dynamic Array M48.8 (Fluidigm; Barcelona, ES).

Los resultados obtenidos de la expresión de los niveles de ARNm se obtuvieron mediante el análisis en paralelo de una curva de estándar con distintas concentraciones del transcrito específico de interés, asimismo, se normalizaron los niveles de expresión gracias al uso de genes estables (housekeeping genes), que en este caso fueron B-actina, hipoxantina-fosforibosil-transferasa (HPRT) y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, del inglés Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase).

Para todo ello se utilizó el software online Metaboanalyst 3.0 (McGill University).

La Tabla 5 resume los genes estudiados, la proteína que codifican y su función, obtenida a través de la página *GeneCards* (<https://www.genecards.org>)

Tabla 5. Función de los genes y marcadores estudiados.

GEN	PROTEÍNA	FUNCIÓN
BCAT1	Transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada	Cataliza la transaminación reversible de alfa- cetoácidos a L-aminoácidos de cadena ramificada esenciales para el crecimiento celular tales como leucina, isoleucina y valina.
CDIPT	CDP-Diacilglicerol - Inositol 3-Fosfatidiltransferasa	Cataliza la biosíntesis de fosfatidilinositol, cuyos metabolitos son segundos mensajeros involucrados en la regulación del crecimiento celular, el metabolismo del calcio y la actividad de la proteína quinasa C.
CHKA	Colina quinasa A	Cataliza el primer paso en la biosíntesis de fosfatidil-colina mediante su fosforilación.
CS	Citrato Sintasa	Enzima del ciclo de Krebs que cataliza la síntesis de citrato a partir de oxaloacetato y acetil Co A.
ETNK1	Etanolamina quinasa 1	Cataliza la fosforilación de etanolamina. Biosíntesis de glicerofosfolípidos
GAD1GAD25	Glutamato Descarboxilasa 1 (25 kDa).	Responsables de catalizar la producción de ácido gamma-aminobutírico a partir de ácido L-glutámico. Involucrado en el metabolismo de la α -alanina y la producción de GABA.
GAD1GAD67	Glutamato Descarboxilasa 1 (67 kDa).	
GCK	Glucoquinasa	Su función es fosforilar la glucosa para producir glucosa-6-fosfato, el primer paso en la mayoría de las vías del metabolismo de la glucosa.
GLS	Glutaminasa	Cataliza la hidrólisis de glutamina a glutamato y amoníaco.
GLUD1	Glutamato deshidrogenasa 1	Cataliza la desaminación oxidativa del glutamato a α -cetoglutarato y amoníaco.
GLUL	Glutamina sintetasa	Cataliza la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amoníaco.
GLUT2	Transportador de glucosa.	Media el transporte bidireccional de la glucosa. Debido a su baja afinidad, se ha sugerido como un sensor de glucosa
GLPD1	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	Cataliza la conversión reversible de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y la reducción de NADH a glicerol-3-fosfato. Metabolismo de carbohidratos y lípidos.
GPT	Alanina aminotransferasa 1	Cataliza la transaminación reversible entre alanina y 2-oxoglutarato para generar piruvato y glutamato. Papel clave en el metabolismo intermedio de la glucosa y los aminoácidos
HK1	Hexoquinasa 1	Cataliza el primer paso esencial del metabolismo de la glucosa, la conversión del sustrato de glucosa en glucosa-6-fosfato
HK2	Hexoquinasa 2	
HK3	Hexoquinasa 3	
IGF 1	Factor de crecimiento similar a insulina.	Estimula la proliferación y crecimiento celular.
IGF 1R	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina	Es una proteína que actúa como receptor transmembrana y se activa por el IGF-1 e IGF-2, mediando el efecto de la IGF-1.
ISYNA1	Inositol-3-fosfato sintasa 1	Desempeña un papel crítico en la ruta de biosíntesis de <i>myo</i> -inositol al catalizar la conversión de la glucosa 6-fosfato en <i>myo</i> -inositol 1-fosfato.
PCa	Piruvato carboxilasa	Cataliza la carboxilación de piruvato a oxaloacetato. Participa en la gluconeogénesis, la lipogénesis y la síntesis del neurotransmisor glutamato.

GEN	PROTEINA	FUNCIÓN
PCYT1A	Colina-fosfato citidililtransferasa 1 alfa	Participa en la regulación de la biosíntesis de fosfatidilcolina
PDE1A	Fosfodiesterasa 1A	Involucrado en la transducción de señales mediante la regulación de las concentraciones de nucleótidos cíclicos intracelulares a través de la hidrólisis de cAMP y cGMP a sus respectivos nucleósidos monofosfatos
PDHA1	Piruvato deshidrogenasa cadena alfa subunidad 1	Catalizan la conversión de piruvato en acetil- CoA y CO ₂ , enlace primario entre la glucólisis y el ciclo de Krebs
PDHA2	Piruvato deshidrogenasa cadena alfa subunidad 2	
PDK1	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1	Papel clave en la regulación del metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos mediante la fosforilación de las subunidades de piruvato deshidrogenasa PDHA1 y PDHA2, inhibe la actividad y, por lo tanto, regula el flujo de metabolitos a través del ciclo del ácido tricarbóxico.
PKFM	Fosfofructoquinasa (músculo)	Cataliza la fosforilación de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato.
PKM	Piruvato quinasa M1/2	Cataliza la transferencia de un grupo fosfato de fosfoenolpiruvato (PEP) a ADP, generando ATP. Implicado en la muerte celular independiente de caspasa de las células tumorales.
PLA2G2A	Fosfolipasa A2 (Grupo IIA)	Cataliza la hidrólisis dependiente de calcio de los grupos 2-acilo en los fosfoglicéridos 3-sn. Participa en la regulación del metabolismo de los fosfolípidos en biomembranas.
PLCG1	Fosfolipasa C gamma 1	Media la producción de segundos mensajeros diacilglicerol-inositol 1,4,5-trifosfato. Juega un papel importante en la regulación de las cascadas de señalización intracelulares y en la reorganización de la actina y la migración celular.
SHMT1	Serina hidroximetiltransferasa 1	Interconversión de serina y glicina.
SLC6A1	Transportador de solutos, familia 6 miembro 1	Transportador de ácido GABA que se localiza en la membrana plasmática. La proteína codificada elimina GABA de la hendidura sináptica, reincorporándola a los terminales presinápticos.
SLC6A17	Transportador de solutos, familia 6 miembro 17	Funciona como un transportador vesicular dependiente de sodio selectivo para prolina, glicina, leucina y alanina.
SMPD1	Esfingomielina fosfodiesterasa 1	Convierte la esfingomielina en ceramida.
LDHA	Lactato deshidrogenasa A	Catalizan la conversión de piruvato en lactato (y viceversa) en condiciones anaeróbicas y es clave en el metabolismo glucolítico alterado que es una característica de las células cancerosas. LDHA posee mayor afinidad por el piruvato mientras que la LDHB por el lactato.
LDHB	Lactato deshidrogenasa B	
MARCADORES TUMORALES		
TP53	Proteína tumoral 53	Actúa como un supresor tumoral en muchos tipos de tumores; induce la detención del crecimiento o la apoptosis según las circunstancias fisiológicas y el tipo de célula
HIF1A	Factor inducible por hipoxia 1 subunidad alfa	Funcionan como reguladores transcripcionales en la respuesta adaptativa a la hipoxia. En condiciones hipóxicas, activan la transcripción de más de 40 genes que aumentan el suministro de oxígeno o facilitan la adaptación metabólica a la hipoxia. Juegan un papel esencial en la vascularización embrionaria y la angiogénesis tumoral
HIF2A	Factor inducible por hipoxia 2 subunidad alfa	
HIF3A	Factor inducible por hipoxia 3 subunidad alfa	
SIRT1	Sirtuína 1 (desacetilasa dependiente de NAD)	Regulador transcripcional epigenético que participa en la coordinación de varias funciones celulares separadas como el ciclo celular, la respuesta al daño del ADN, el metabolismo, la apoptosis y la autofagia

3.3. Evaluación de la supervivencia

3.3.1. Estudio retrospectivo.

En el estudio retrospectivo se realizó un análisis estadístico para evaluar la capacidad predictiva de supervivencia global (SG) de los biomarcadores metabólicos detectados mediante ^1H AR-ERM. Se excluyeron del análisis los pacientes cuyo seguimiento se había perdido ($n = 10$), y aquellos intervenidos por recidiva ($n = 7$) (Figura 14). Los gliomas grado I ($n = 3$) también fueron excluidos debido a sus conocidas diferencias fisiopatológicas con los otros grados de glioma^{64,65}.

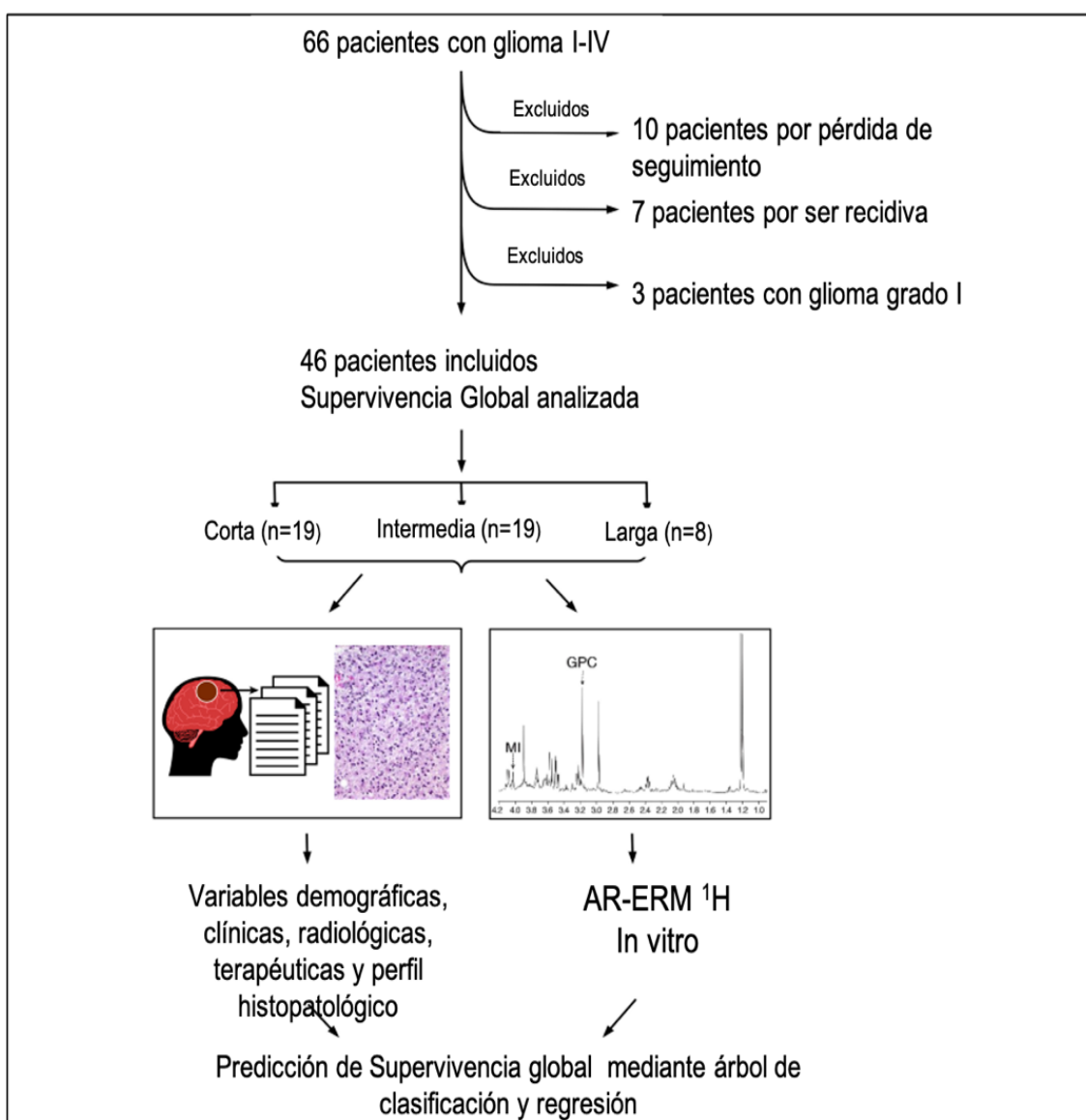


Figura 14. Flujo de trabajo (Work-Flow) en el estudio retrospectivo. Resumen de pacientes incluidos y excluidos.

Se crearon los grupos de SG según lo siguiente: se apreciaron dos grupos de supervivencia global (SG) claramente diferenciados en la gráfica de distribución de la SG de la muestra (figura 14 y 18). Se dividieron pacientes con SG larga, con supervivencias superiores a 364 semanas (smn), y pacientes con Supervivencia Global más corta, con supervivencias inferiores a 364 smn. Este último grupo, fue dividido de nuevo en dos grupos usando la mediana de SG como punto de corte, resultando en pacientes con SG entre 1 y 52 smn, denominado SG-Corta, y pacientes con SG entre 53 y 364 smn, denominado SG-Intermedia, respectivamente.

Los análisis estadísticos se realizaron en una plataforma Intel-PC, operando un entorno Windows 10, utilizando SPSS Statistics de IBM. Primero se realizó un análisis estadístico univariante, calculando las medias y los errores estándar para las fracciones molares de cada metabolito. Para investigar las relaciones estadísticas entre las características clínicas y los grupos de SG, usamos el test chi-cuadrado con test de probabilidad Montecarlo y para comprobar las diferencias entre las medias de cada metabolito utilizamos el test ANOVA y t-student.

Finalmente, con el objetivo de explorar la contribución de cada biomarcador obtenido mediante AR-ERM ¹H a los tres grupos de SG, implementamos el método de clasificación y regresión "Classification Regression Tree" (en inglés CRT) diseñado por Breiman et al⁷². El método proporciona de árbol de clasificación dicotómica que estratifica automáticamente la base de datos mediante nodos y ramas jerárquicas, seleccionando, paso a paso, el biomarcador discriminante óptimo para cada división. La variable dependiente es SG, y se utilizó la Detección Automática de Interacción de Chi-cuadrado (CHAID) como método de cultivo para proporcionar automáticamente las divisiones óptimas en cada rama. Finalmente, utilizamos todos los datos para generar una Matriz de Clasificación-Confusión (MCC), detectando las clasificaciones correctas e incorrectas proporcionadas por el árbol de clasificación metabolómica, proporcionando el porcentaje global de clasificaciones correctas. La significación estadística en el ANOVA y el análisis multivariado se definió como $p < 0,05$.

3.3.2. Estudio prospectivo

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS Statistics de IBM en una plataforma Intel-PC, bajo un entorno Windows 10.

Inicialmente se estudiaron las diferencias de resultados de SG (cuantitativa, expresada en días) en función de factores clínicos, demográficos e histopatológicos utilizando pruebas no paramétricas (Test de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis con corrección exacta de Montecarlo) sobre el total de la muestra considerada N=100.

Se obtuvo una identificación de perfiles de SG utilizando un análisis de cluster de k-medias que dividió la muestra en 3 grupos de SG en función de cambios en su función de densidad. Estos tres perfiles se denominaron CSG (menor a 500 días de supervivencia), ISG (500-1000) días de supervivencia) y LSG (mayor o igual a 1000 días de supervivencia). Nuevamente N=100.

En el estudio prospectivo, a diferencia del retrospectivo, la cuantificación de concentración de cada metabolito fue determinada calculando la concentración relativa de cada uno respecto al contenido total de creatina (Cr+PCr) en la muestra; esta expresión muestra una distribución de cocientes no gaussiana y como alternativa a modelos paramétricos se utilizó un Test de medianas para contrastar las diferencias que presentaban los metabolitos en función del factor de SG (niveles CSG, ISG, LSG). Las diferencias son más difíciles que probar que en el caso anterior. N=79 debido a datos faltantes en metabolitos.

Se estudió también la relación entre metabolitos y SG (cuantitativa) por medio de correlaciones de Spearman observándose que la relación no era lineal ni independiente entre metabolitos. Así se plantearon modelos de relación, con selección de variables independientes en procesos jerárquicos y obteniendo árboles de clasificación explicativos y predictivos.

Se planteó un modelo de clasificación sobre SG cualitativa (niveles CSG, ISG, LSG) y un segundo sobre SG (cuantitativa). En ambos casos N=79. Para encontrar el mejor árbol de clasificación se utilizaron técnicas CRT (clasificación binaria) o CHAID (no necesariamente binaria). La selección de los metabolitos que generan un perfil más discriminante en cada paso es automático, la elige el modelo por su potencia diferenciadora, y por tanto son la mejor solución estadística posible para establecer perfiles sobre la variable dependiente (SG).

Se estudiaron sucesivamente soluciones sobre la submuestra de casos grado histológico III o IV (N=68) y sobre la muestra de grado histológico IV (N=59), con el propósito de determinar si los metabolitos elegidos en cada paso y su combinación eran diferentes a cuando se incluyen casos de grado II con mayor supervivencia.

Por su parte, los perfiles de expresión génica fueron categorizados variable a variable tomando como referencia la mediana en cada caso para estudiar su impacto en la SG. En el análisis univariante se ajustaron funciones de supervivencia según el método de Kaplan-Meier y se realizó una comparación entre las categorías por encima y por debajo de la mediana en cada variable mediante el test de Log-Rank o el de Breslow, si las curvas se cruzaban. En este caso N=41 comprendiendo casos de todos los grados.

Para comparar los hallazgos de perfil genético entre IDH1 mutados y wild-type se asumió la normalidad y se utilizó el test t Student, tomando como umbral de significación $p < 0,05$.

En cuanto a la interactómica, se realizó en primer lugar un análisis de componentes principales y se utilizaron los primeros componentes calculados para diferenciar los tumores IDH mutados de los wild-type (función *pca*, paquete *mixOmics*). Se usó un gráfico de círculo de correlación (función *plotvar*, paquete *mixOmics*) para mostrar la correlación de cada variable con los componentes principales más importantes. La función *heatmap* del paquete *stats* se utilizó para estudiar las agrupaciones de variables en un gráfico de colores y se utilizaron gráficos de correlación (función *corrplot*, paquete *corrplot*) a partir de una matriz de correlación creada con la función *cor* del paquete *stats*. También se analizó la idoneidad de la estandarización de los datos genéticos y espectroscópicos mediante gráficos de correlación en red (paquetes *corr* y *ggraph*). Para su uso en los análisis interactómicos, los perfiles de expresión génica, al igual que los metabólicos, fueron finalmente estandarizados por la suma del total de todos los genes analizados. Por último, se clasificaron las variables y las muestras mediante un análisis de clusters supervisado (*sparse partial least squares discriminant analysis*, función *splsda*, paquete *mixOmics*) y se representó el resultado en un mapa de colores con la función *cim* del mismo paquete. Para todos los análisis se utilizó la última versión de R disponible (4.0.3)⁷³.

Finalmente para la relación entre metabolitos y genes se seleccionó la muestra que tuviera completa toda la información, resultando N=29. Con este conjunto de datos y todas las variables de expresión génica y metabólica transformadas para tratarlas paramétricamente se obtuvieron correlaciones de Pearson y se plantearon modelos de regresión lineal por pasos para seleccionar el conjunto de genes que pudieran explicar la expresión metabólica y quizá la SG. Se observó gráficamente que las relaciones más importantes no expresaran heterocedasticidad.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio retrospectivo

4.1.1. Características Clínicas

La base de datos está constituida por 46 pacientes (23 hombres y 23 mujeres) de glioma con una edad media de 49 años, con los siguientes grados: Grado II (11 casos), Grado III (16 casos), y Grado IV (19 casos). Se aprecian dos grupos de supervivencia global (SG) claramente diferenciados: pacientes con SG larga (LSG), con supervivencias superiores a 364 semanas (smn), y pacientes con Supervivencia Global más corta, con supervivencias inferiores a 364 smn.

Tabla 6. Características clínicas base de datos retrospectiva

Características		Supervivencia Global			N de pacientes (% columna)	Chi-square
		Corta n(% línea)	Intermedia n(% línea)	Larga n(% línea)		
Edad	<25 años	0 (0,0%)	5 (62,5%)	3(37,5%)	8 (17,4%)	0,01
	25-54 años	5 (31,3%)	7 (43,8%)	4(25%)	16 (34,8%)	
	>54 años	14 (63,6%)	7 (31,8%)	1 (4,5%)	22 (47,8%)	
Sexo	Mujer	8 (34,8%)	11(47,8%)	4 (17,4%)	23 (50%)	0,74
	Varón	11(47,8%)	8 (34,8%)	4 (17,4%)	23 (50%)	
Comorbilidad^a	Sí	10 (34,5%)	13 (44,8%)	6 (20,7%)	29 (63%)	0,56
	No	9 (52,9%)	6 (35,3%)	2 (11,8%)	17 (37%)	
Localización^b	A	2 (15,4%)	7 (53,8%)	4 (30,8%)	13 (30,2%)	0,04
	B	5 (41,7%)	6 (50%)	1 (8,3%)	12 (27,9%)	
	C	12 (66,7%)	3 (16,7%)	3 (16,7%)	18 (41,9%)	
Volumen tumoral^b	Pequeño	13 (39,4%)	15 (45,5%)	5 (15,2%)	33 (73,3%)	0,49
	Grande	6 (50%)	3 (25%)	3 (25%)	12 (26,7%)	
Elocuencia^b	Sí	16 (53,3%)	10 (33,3%)	4 (13,3%)	30 (69,8%)	0,19
	No	3 (23,1%)	6 (46,2%)	4(3,8%)	13 (30,2%)	
Resección	Parcial o Completa	10 (52,6%)	5 (26,3%)	4 (21,1%)	19 (41,3%)	0,27
	Biopsia	9 (33,3%)	14 (51,9%)	4 (14,8%)	27 (58,7%)	
Radioterapia	Sí	19 (54,3%)	12 (34,3%)	4 (11,4%)	35 (76,1%)	0,003
	No	0 (0%)	7 (63,6%)	4 (36,4%)	11 (23,9%)	
Quimioterapia	Sí	0 (0%)	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (6,5%)	0,07
	No	19 (44,2%)	18 (41,9%)	6 (14%)	43 (93,5%)	
Grado histopatológico^c	II	0 (0%)	6 (54,5%)	5 (45,5%)	11 (23,9%)	< 0,001
	III	3 (18,8%)	10 (62,5%)	3 (18,8%)	16 (34,8%)	
	IV	16(84,2%)	3 (15,8%)	0 (0%)	19 (41,3%)	

^aHipertensión arterial, diabetes mellitus y/o enfermedad pulmonar, renal, cardíaca, oncológica u otra enfermedad severa, ^bClasificación of tumores según Shinoda et al., ^cGrado histopatológico según la clasificación WHO 1997

Este último grupo, fue dividido de nuevo en dos grupos usando la mediana de SG como punto de corte, resultando en pacientes con SG entre 1 y 52 smn, denominado SG-Corta (CSG), y pacientes con SG entre 53 y 364 smn, denominado SG-Intermedia (ISG), respectivamente.

La Tabla 6 resume los datos demográficos, clínicos, radiológicos, y terapéuticos, así como los perfiles histopatológicos de estos grupos. Se realizó entonces, una prueba de Chi-cuadrado de Monte-Carlo, para comparar las diferencias entre las tres categorías. Entre todos los parámetros comparados, tan sólo el tratamiento con radioterapia, el grado histopatológico, la edad y la localización demostraron tener una asociación estadísticamente significativa con la SG.

4.1.2 **Análisis estadístico univariante**

La SG queda bien reflejada en los perfiles metabólicos obtenidos, con relaciones evidentes entre SG y los cambios observados en metabolitos específicos (Figura 15).

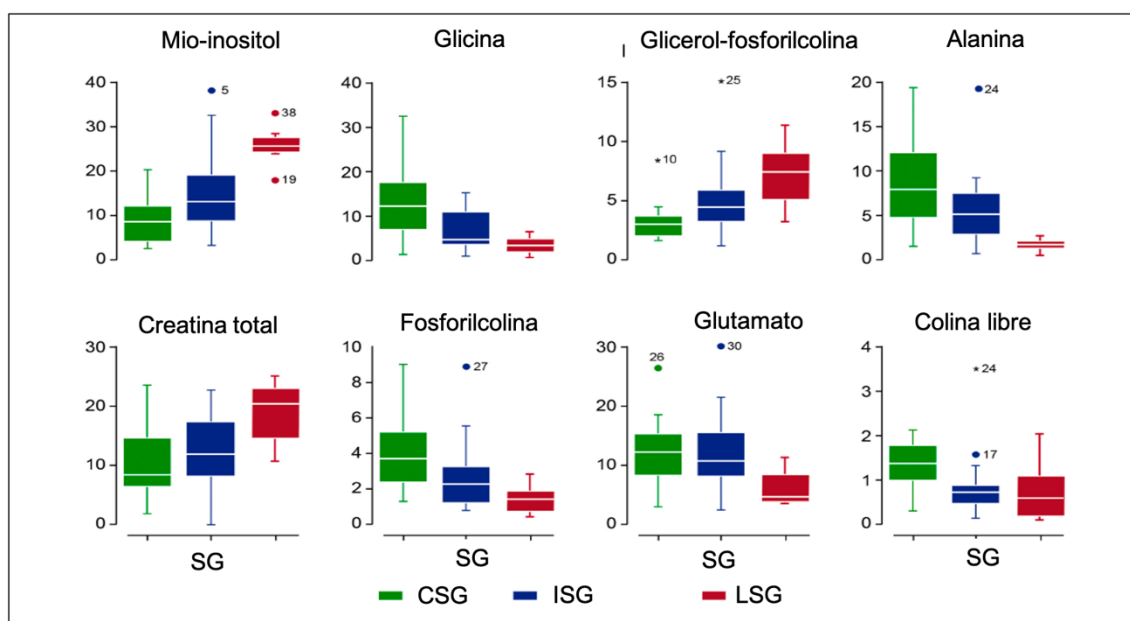


Figura 15. Relación entre diversos metabolitos y los niveles de SG corta (CSG, en verde), intermedia (ISG en azul) y larga (LSG en rojo).

La Tabla 7 proporciona un análisis más detallado de la relación entre la SG y las fracciones molares de metabolitos específicos, mostrando el poder discriminante de cada metabolito en la SG (valor F) y su significación estadística (valor p) según el test ANOVA (resultados significativos en negrita).

Tabla 7. Análisis univariante de la Supervivencia Global en función del perfil metabólico obtenido mediante HR-ERM ¹H

SUPERVIVENCIA GLOBAL ^a						
Metabolito	Corta (n=19)	Intermedia (n=19)	Larga (n=8)	Total	F ^b	p
<i>MI</i>	9,03±1,26	14,75±2,14	25,72±1,51	14,30±1,36	15,10	<0,001
<i>Ala</i>	8,47±1,12	5,67±0,95	1,67±0,24	6,13±0,70	13,65	<0,001
<i>GPC</i>	3,17±0,34	5,17±0,72	7,18±0,97	4,70±0,42	9,44	<0,001
<i>Gly</i>	13,38±1,89	6,95±1,03	3,61±0,68	9,03±1,05	9,37	<0,001
<i>PC</i>	4,17±0,48	2,84±0,48	1,43±0,28	3,14±0,32	8,36	0,001
<i>tCr</i>	13,36±1,10	15,03±1,19	20,84±1,63	15,35±0,81	6,53	0,003
<i>Ac</i>	4,49±0,97	3,09±0,81	0,94±0,17	3,30±0,55	5,72	0,006
<i>fCho</i>	1,33±0,13	0,86±0,17	0,73±0,24	1,03±0,10	4,65	0,01
<i>Glu</i>	12,20±1,27	12,09±1,56	6,04±1,16	11,08±0,91	3,62	0,03
<i>Gln</i>	15,47±1,19	18,76±1,38	18,51±1,30	17,36±0,81	2,02	0,14
<i>Val</i>	2,34±0,47	1,60±0,43	1,45±0,23	1,88±0,27	0,896	0,42
<i>Asp</i>	0,77±0,14	0,70±0,14	0,50±0,12	0,69±0,09	0,584	0,56
<i>NAA</i>	3,35±0,94	4,57±0,95	4,55±0,94	4,06±0,57	0,544	0,58
<i>GABA</i>	1,25±0,31	0,92±0,15	1,17±0,33	1,10±0,15	0,483	0,62
<i>Tau</i>	5,69±0,79	6,17±0,71	4,95±0,63	5,76±0,45	0,416	0,66
<i>tCho</i>	8,67±0,57	8,88±0,76	9,33±1,02	8,87±0,42	0,145	0,86

^a Resultados expresados como media ± error estándar de la media.

^b Transformación Box Cox usando análisis ANOVA

Ac: Acetato, Ala: Alanina, Asp: ácido aspártico, fCho: colina libre, GABA: ácido gamma-aminobutírico, Gln: glutamina, Glu: glutamato, Gly: glicina, GPC: glicerolfosfolina, MI: *myo*-inositol, NAA: ácido N-acetil-aspártico, PC: fosforil-colina, Tau: taurina, tCr: creatina total, Val: valina

Brevemente, á SG aumenta con el incremento en MI, GPC, y tCr, y disminuye al aumentar Ala, colina libre (fCho), Glu, PC y Gly. El resto metabolitos detectados por AR-RMN ¹H, incluyendo Ac, Gln, Val, Asp, NAA, GABA, Tau, y tCho no muestran una influencia significativa en SG. Los discriminantes más potentes en SG son (metabolito/valor F/valor p) en orden decreciente: MI/15,1/0,000, Ala/13,6/0,000, GPC/9,5/0,001, Gly/9,4/0,000, tCr/6,5/0,003, Ac/5,7/0,006, fCho/4,6/0,015 y Glu/3,6/0,035.

También investigamos la relación entre grado histopatológico y las fracciones molares de los metabolitos detectables en extractos de biopsias de glioma mediante pruebas ANOVA (Tabla 8). Curiosamente, la prioridad de los metabolitos que proporcionan la mejor discriminación entre los grados de glioma, es diferente de la que proporciona la mejor discriminación en la SG (Tabla 7).

Las siguientes fracciones molares de metabolitos proporcionaban un poder discriminante óptimo entre grados histopatológicos (metabolito/Valor/F/valor); MI/21,7/0,000, PC/11,7/0,000, GPC/9,2/0,000, Ala/8,8/0,001, Gly/6,5/0,003, tCr/6,3/0,004, Glu 5,9/0,005 y Gln/3,5/0,040. Tomados en conjunto, estos resultados muestran, priorizadamente, los metabolitos que resultan más relevantes para predecir grado histopatológico, o la SG.

Tabla 8. Correlación entre grado histológico y niveles de metabolitos obtenidos mediante ¹H AR-ERM.

METABOLITOS	GRADO HISTOLÓGICO ^a					
	IV n=11	III n=16	II n=19	Total	F	p
MI	8,41±1,09 ^a	13,94±1,95	24,99±2,3	14,3±1,36	21,71 ^b	< 0,000
PC	4,36±0,56	2,90±0,36	1,40±0,25	3,14±0,32	11,74	< 0,000
GPC	3,01±0,19	5,32±0,84	6,70±0,87	4,70±0,42	9,16	< 0,000
Ala	8,36±1,15	5,77±1,09	2,82±0,69	6,13±0,7	8,85	0,001
Gly	12,74±1,9	7,98±1,42	4,14±0,53	9,03±1,05	6,4	0,003
tCr	13,54±1,17	14,35±1,31	19,94±1,28	15,35±0,81	6,30	0,004
Glu	13,85±1,55	10,89±1,32	6,59±0,95	11,08±0,91	5,90	0,005
Succ	1,36±0,49	1,11±0,2	0,58±0,08	1,09±0,22	3,99	0,03
Gln	14,95±1,14	19,05±1,31	19,05±1,67	17,36±0,81	3,47	0,04
fCho	1,23±0,13	1,05±0,21	0,67±0,16	1,03±0,1	3,10	0,05
Val	2,32±0,48	1,97±0,49	0,98±0,11	1,88±0,27	2,51	0,09
Asp	0,88±0,16	0,63±0,12	0,47±0,12	0,69±0,09	1,93	0,16
Ac	3,75±0,96	3,68±0,98	1,95±0,67	3,30±0,55	1,49	0,24
Tau	6,09±0,85	6,05±0,74	4,77±0,46	5,76±0,45	0,42	0,66
tCho	8,60±0,57	9,27±0,86	8,76±0,83	8,87±0,42	0,24	0,79
GABA	1,03±0,19	1,25±0,36	1,02±0,23	1,10±0,15	0,23	0,80
NAA	4,14±1,17	4,06±0,86	3,94±0,49	4,06±0,57	0,01	0,99

^a Resultados expresados como media ± desviación estándar

^b Transformación Box Cox previa al análisis ANOVA

4.1.3. Árbol de clasificación y regresión (Classification Regression Tree, CRT)

Con el objetivo de investigar cuantitativamente la contribución de estos metabolitos a la SG observada, implementamos una estrategia basada en la generación de un árbol de clasificación regresión multivariante (CRT, Figura 16). Este abordaje proporciona una clasificación de la SG, basada en divisiones

dicotómicas y jerárquicas en Nodos y ramas, que revelan la contribución de cada metabolito a las supervivencias largas (LSG), intermedias (ISG) y cortas (CSG).

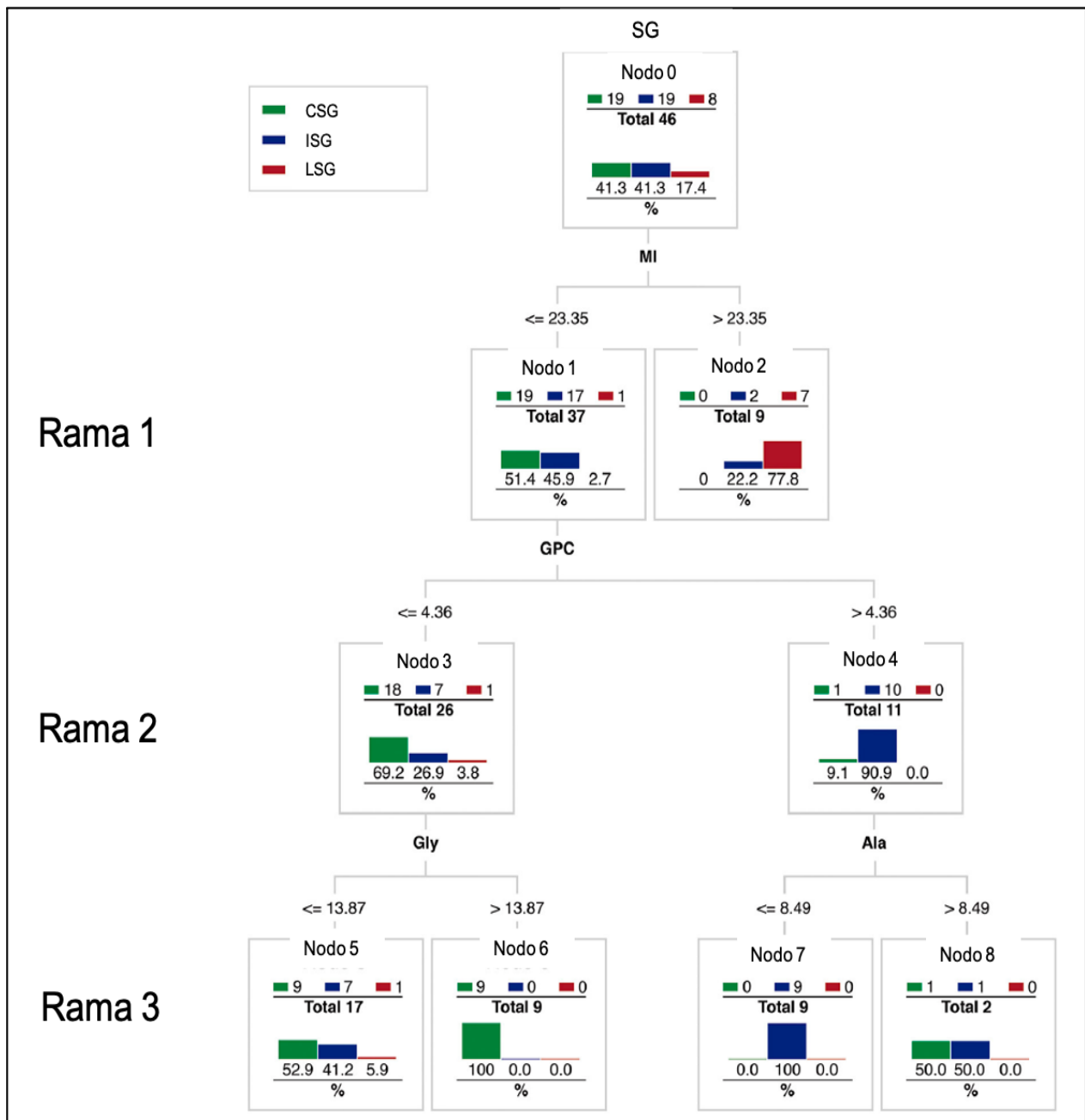


Figura 16. Árbol de clasificación y regresión multivariante entre SG y niveles de diversos metabolitos.

Comenzando con la base de datos completa de pacientes (Nodo 0), los niveles altos de MI (Rama 1) constituyeron el biomarcador más potente para predecir la supervivencia en los tres grupos de SG. Más concretamente, encontramos niveles de MI $\leq 23,35$ en biopsias de 37 pacientes (Nodo 1), de los

que tan sólo uno sobrevivió más de 7 años (LSG), mientras que el resto correspondían al grupo de ISG (17 pacientes) o CSG (19 pacientes). En cambio, encontramos niveles $MI > 23,35$ en nueve biopsias (Nodo 2), de las que siete (77,8%) presentaron LSG, dos ISG, y ninguna CSG, indicando claramente que niveles altos de MI sugieren SG largas (SGL) o intermedias (ISG), y descartan supervivencias cortas (CSG).

Los pacientes con niveles de $MI \leq 23,35$ pueden ser divididos en dos subgrupos basándonos en los niveles de GPC (Rama 2). De hecho, el 69% de los pacientes que presentan niveles de $GPC \leq 4,36$ (Nodo 3) se clasifican como CSG, mientras que el 91% de los pacientes con $GPC > 4,36$ (Nodo 4) se clasifican como ISG. Consecuentemente, GPC proporciona un biomarcador fiable para distinguir entre pacientes con CSG e ISG.

En definitiva, los niveles de MI y GPC constituyen potentes biomarcadores para clasificar, de forma estadísticamente significativa, todos los pacientes en los tres grupos de SG.

El CRT metabólico crece más allá de la Ramificación 2, mejorando las clasificaciones anteriores, utilizando los niveles Gly o Ala (Rama 3). Todos los pacientes del Nodo 3 con niveles de Gly superiores a 13,87 (Nodo 6), pertenecieron al grupo de CSG, sugiriendo que los niveles altos de Gly apoyan un mal pronóstico. Asimismo, los pacientes del nodo 4, pueden ser estratificados adicionalmente por sus niveles de Ala. En particular, aquellos pacientes con niveles de $Ala < 8,48$ (Nodo 7) revelan supervivencias intermedias (100%).

De esa manera, el CRT metabólico revela el papel dominante de MI, GPC, Ala y Gly en la predicción de la SG en los pacientes con glioma cerebral.

Finalmente, con el objetivo de evaluar el poder de predicción de nuestro árbol de clasificación, comparamos el número de predicciones correctas derivadas del CRT metabólico, con las observadas clínicamente en la matriz de confusión de la Tabla 9. Más concretamente, de los 19 pacientes del grupo CSG, 18 han sido clasificados correctamente por nuestro algoritmo. En el caso de los pacientes con ISG, 15 de los 19 pacientes fueron también clasificados correctamente. Finalmente, de los 8 pacientes dentro del grupo de LSG, 6 resultaron correctamente clasificados.

Tabla 9. Matriz de clasificación/confusión de respuestas correctas e incorrectas de SG en pacientes con glioma utilizando criterios metabólicos

Supervivencia Global observada (n=46)	Predicción de Supervivencia Global			Porcentaje clasificaciones correctas
	Corta	Intermedia	Larga	
Corta (n=19)	18	1	0	94,7 %
Intermedia (n=19)	4	15	0	78,9%
Larga (n=8)	1	1	6	75,0%
				84,7%

Las celdas con fondo gris indican el porcentaje de clasificaciones correctas. Las celdas blancas indican las clasificaciones incorrectas. Método: CRT, variable dependiente Supervivencia Global

En resumen, la clasificación metabólica obtenida permite predecir la SG en los tres grupos, separando bien los pacientes de los grupos de SG más largos (ISG y LSG) de aquellos con supervivencias más cortas (CSG). Esto supone una considerable aportación, ya que la predicción de la SG en pacientes con glioma sigue siendo en la actualidad un reto para neurocirujanos, con importantes implicaciones en la decisión de la estrategia terapéutica recomendada.

4.2. Estudio prospectivo

4.2.1. Características clínicas

Se investigaron 100 pacientes (41 hombres y 59 mujeres) con gliomas grado II (12 pacientes), III (9 pacientes) y IV (79 pacientes) con una edad media y mediana de 54 años en ambos estadísticos, lo que revela centralidad y distribución simétrica en esta variable. Los datos demográficos, clínicos, perfiles histopatológicos y biomoleculares se resumen en la tabla 10.

Tabla 10. Datos demográficos, clínicos, histopatológicos y biomoleculares en relación a Supervivencia Global observada en días

Datos demográficos, clínicos, histopatológicos, biomoleculares		N	% Columnas	Supervivencia Global			p*
				Median a	Media	EEM	
Sexo	Hombre	41	41,0%	561	636	66	0,796
	Mujer	59	59,0%	538	587	48	
IDH 1	Wild-type	81	81,0%	484	528	36	0,000
	Mutada	19	19,0%	953	944	103	
ATRX	No mutada	43	78,2%	479	559	58	0,003
	Mutada	12	21,8%	824	1004	131	
Resección	Total	39	39,0%	582	631	53	0,264
	Parcial	61	61,0%	501	593	54	
Grado histológico	II	12	12,0%	878	972	165	0,005
	III	9	9,0%	889	803	125	
	IV	79	79,0%	484	530	35	
Edad	<30	3	3,0%	729	864	438	0,069
	[30-40)	12	12,0%	737	804	119	
	[40-50)	25	25,0%	532	590	82	
	[50-60)	23	23,0%	656	693	68	
	[60-70)	26	26,0%	418	457	61	
	>=70	11	11,0%	462	538	119	

*p corresponde a pruebas no paramétricas, test de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis con corrección exacta de Montecarlo. Los resultados estadísticamente significativos se encuentran resaltados en negrita. EEM indica error estándar de la media

De entre las características clínicas, radiológicas e histopatológicas, grado histológico, ATRX e IDH1 demostraron tener una asociación estadísticamente significativa con la SG. Las mutaciones IDH1 y ATRX no se asocian a SG de forma independiente, sino que también guardan una fuerte relación con el grado histológico, más relevante en IDH1 (Figura 17).

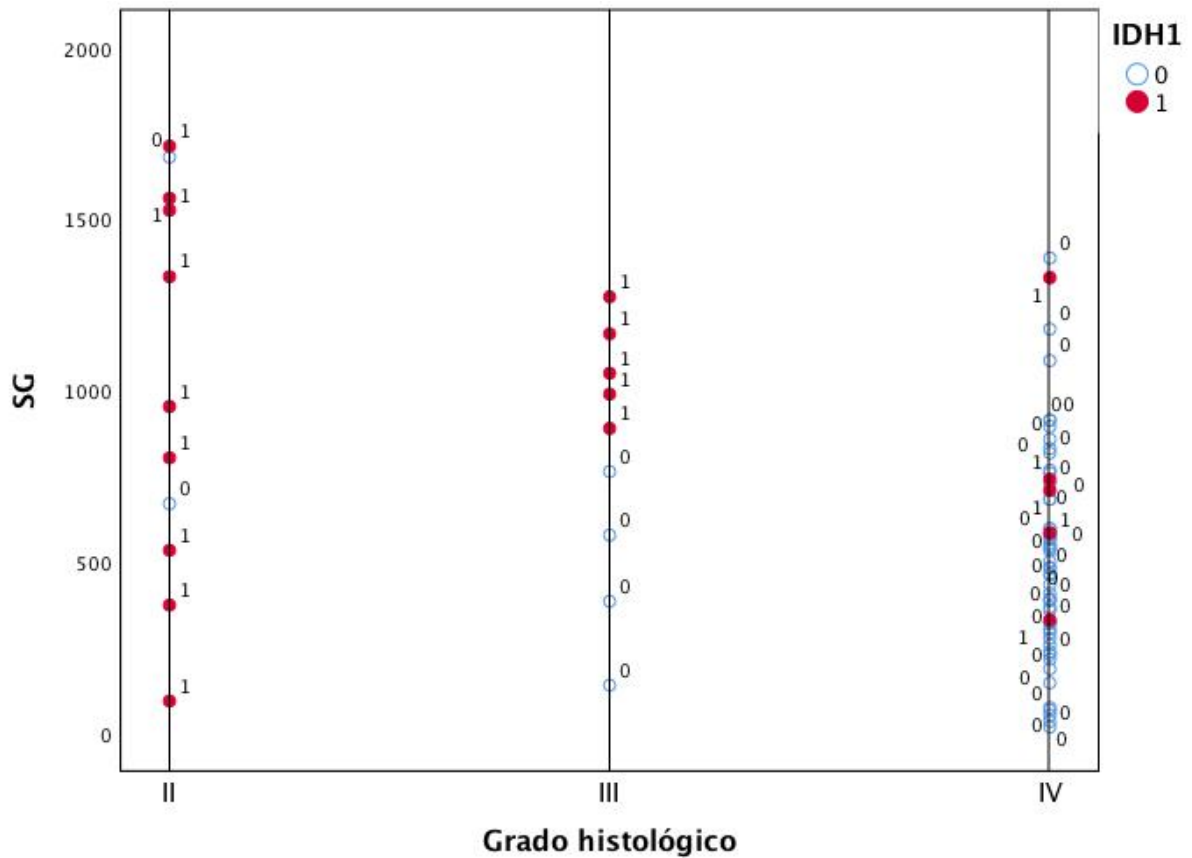


Figura 17. Distribución de las muestras según grado histológico e IDH1. 0/1 corresponden a valores de IDH1 no mutada/mutada. ATRX no mutado en azul, ATRX mutado en rojo.

Con el objetivo de obtener perfiles de SG analizamos la distribución de la muestra a lo largo de los 1750 días de seguimiento (Figura 18). La SG media y la mediana fue de 548 días, el análisis clúster de k-medias permite establecer la mejor clasificación en función de la distribución propia de la muestra. Se conforman así tres grupos de SG: corta (CSG, ≤ 500 días, 45 pacientes), intermedia (ISG, 500-1000 días, 41 pacientes) y larga (LSG, ≥ 1000 días, 14 pacientes).

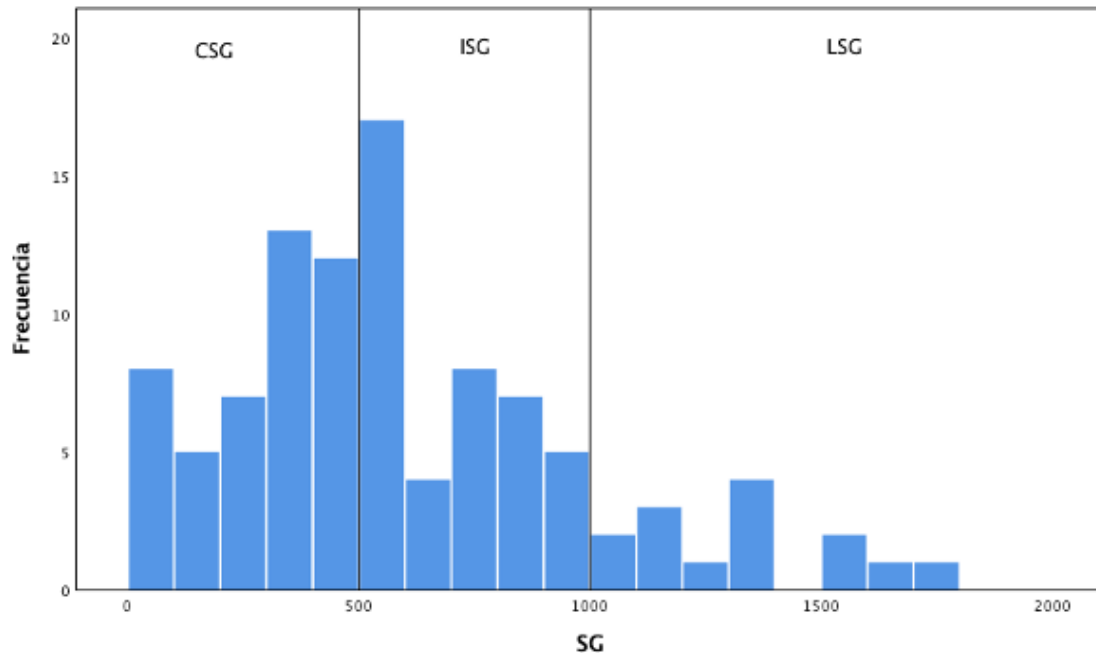


Figura 18. Grupos de supervivencia global corta (CSG), intermedia (ISG) y larga (LSG) en el estudio prospectivo.

4.2.2. Análisis estadístico univariante

Para estudiar la correlación entre patrón espectroscópico obtenido con HRMAS y SG, se seleccionaron aquellos pacientes en los que se disponía de datos metabólicos completos, quedando incluidos 79 pacientes. La Tabla 11 muestra los metabolitos más relevantes, en función del grupo de supervivencia. Las pruebas son no paramétricas (Test de medianas) y las medidas no son gaussianas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en MI, Cho, Glu y el ratio GPC/PC, $p < 0,05$.

Tabla 11. Descripción de metabolitos y grupos de SG (test de medianas)

Metabolitos		Supervivencia Global			Total	p (test de medianas)
		CSG (N=33)	ISG (N=34)	LSG(N=12)		
MI	Mediana	0,512	0,684	1,009	0,604	0,014
	Media	0,561	0,745	0,843	0,683	
	EEM	0,072	0,096	0,155	0,057	
NAA	Mediana	0,157	0,192	0,225	0,177	0,381
	Media	0,217	0,252	0,243	0,236	
	EEM	0,044	0,045	0,068	0,028	
Ala	Mediana	0,539	0,956	0,075	0,552	0,076
	Media	0,722	0,911	0,378	0,751	
	EEM	0,121	0,136	0,187	0,084	
Lac	Mediana	3,466	4,274	1,246	3,511	0,130
	Media	4,763	4,696	2,229	4,349	
	EEM	0,694	0,668	0,640	0,428	
Cho	Mediana	0,103	0,133	0,056	0,098	0,048
	Media	0,144	0,180	0,071	0,148	
	EEM	0,028	0,037	0,017	0,020	
Glu	Mediana	1,092	1,876	0,576	1,105	0,027
	Media	1,412	1,904	0,896	1,545	
	EEM	0,139	0,218	0,278	0,123	
Gly	Mediana	0,647	0,658	,001	0,586	0,170
	Media	1,121	1,158	0,704	1,072	
	EEM	0,270	0,250	0,406	0,167	
Cociente GPC/PC	Mediana	0,609	0,896	0,519	0,709	0,035
	Media	0,760	0,983	0,582	0,829	
	EEM	0,096	0,109	0,098	0,065	

*p corresponde a pruebas no paramétricas, test de medianas. Las medidas significativas se muestran en negrita. P<0,05.

La Figura 19 muestra la relación entre los metabolitos y la SG empleando una transformación logarítmica, para corregir los valores extremos. Tomando el gráfico y la tabla anterior, se observa como MI y NAA se relacionan positivamente con SG, mientras que el resto de metabolitos destacan por minimizar sus valores en LSG, tanto en media como en mediana. Las diferencias entre CSG y ISG son difíciles de establecer con este análisis.

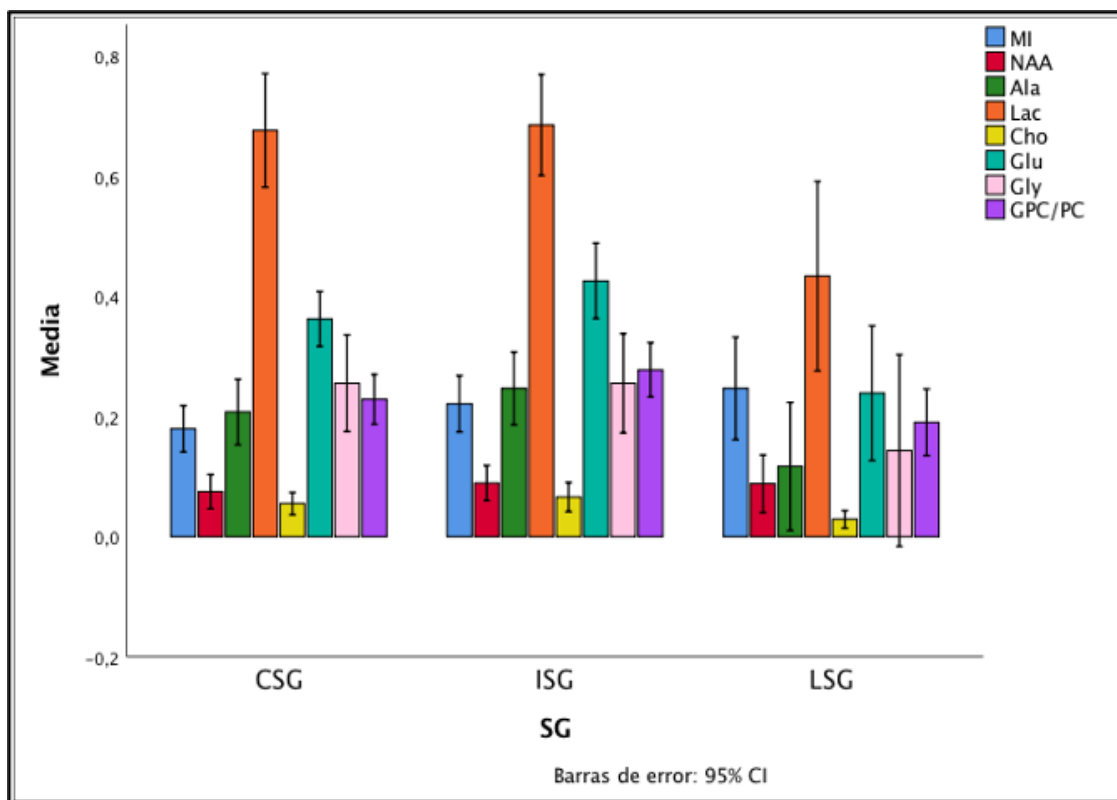


Figura 19. Patrones metabólicos para cada grupo de Supervivencia Global (SG) corta (CSG), intermedia (ISG) y larga (LSG).

Tanto en la Tabla 11 como en la Figura 19 los resultados revelan que la relación entre los metabolitos y la supervivencia no es siempre linealmente creciente o decreciente, presentando en muchos casos una tendencia bifásica, con aumentos y disminuciones dependiendo del grupo SG. En el caso del MI, su concentración se relaciona directamente con la SG. En cambio, en el caso de Cho, Glu y Gly (también estadísticamente significativos), observamos un comportamiento bifásico, ya que su concentración es muy baja en los pacientes con LSG y sube en los de CSG e ISG. Al analizarlos sólo en pacientes con CSG e ISG hallamos que su concentración se relaciona de forma linealmente creciente con la SG. De esta manera, cuando aislamos sólo estos dos grupos, la concentración baja de estos metabolitos indica CSG.

4.2.3. Clasificación y regresión mediante árboles jerarquizados

El modelo de clasificación jerárquica mediante árbol de regresión, proporciona la combinación de biomarcadores que mejor explican la SG (Figura 20).

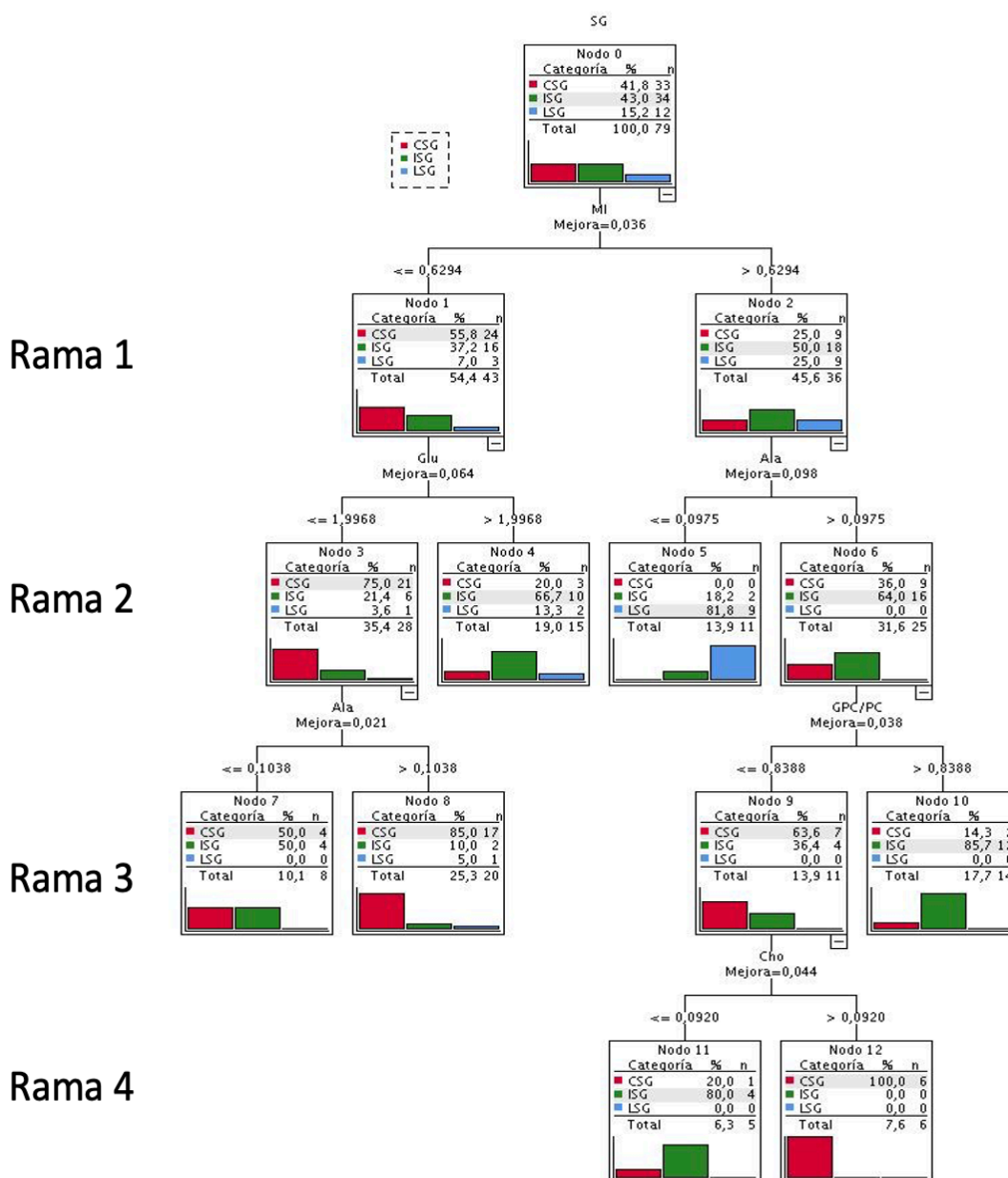


Figura 20. Árbol de clasificación y regresión metabolitos y Supervivencia Global (SG, variable categorizada)

Este proceso involucra un procedimiento de clasificación por pasos cuya técnica puede ser binaria (modelo CRT), o no (modelo CHAID), que detecta

jerárquicamente, la combinación de metabolitos más idóneos en la clasificación y en qué rangos identifican patrones de menor o mayor supervivencia.

La primera solución clasificatoria se obtiene tomando SG de forma categorizada según los grupos definidos anteriormente. Esta solución, calculada con CRT, ofrece necesariamente soluciones dicotómicas en cada paso. En los primeros pasos selecciona los mismos metabolitos que el modelo retrospectivo, pero en el estudio prospectivo, continúa incorporando soluciones de mejora con un mayor número de metabolitos. Los metabolitos seleccionados en esta clasificación son MI, Ala, Glu, GPC/PC y Cho. CSG está asociado principalmente a un patrón de bajo MI, bajo Glu y alto nivel de Ala. Sin embargo, CSG puede encontrarse también asociado a MI alto, si al mismo tiempo Ala es alta, GPC/PC es baja y Cho alta.

Por otro lado, ISG se asocia a MI bajo, y Glu alto. ISG se encuentra también asociado a situaciones donde las concentraciones de MI, Ala y GPC/PC son altas.

En conclusión, MI y Ala altos podrían determinar CSG o ISG, con GPC/PC como el biomarcador que discriminaría posteriormente entre ellos, con un valor bajo asociado a CSG, y alto a ISG.

Notablemente, LSG está asociado a MI alto y Ala bajo, como en el estudio retrospectivo. Este resultado es especialmente significativo porque de 12 elementos que contiene el grupo, 9 cumplen este patrón.

En una segunda aproximación intentamos explicar cuantitativamente SG buscando los puntos de corte en los metabolitos que propician patrones SG estadísticamente diferentes. En este caso implementamos la técnica de segmentación CHAID, con la selección por pasos del metabolito más discriminante, y su punto de corte. El mejor resultado de clasificación se muestra en el árbol siguiente (figura 21).

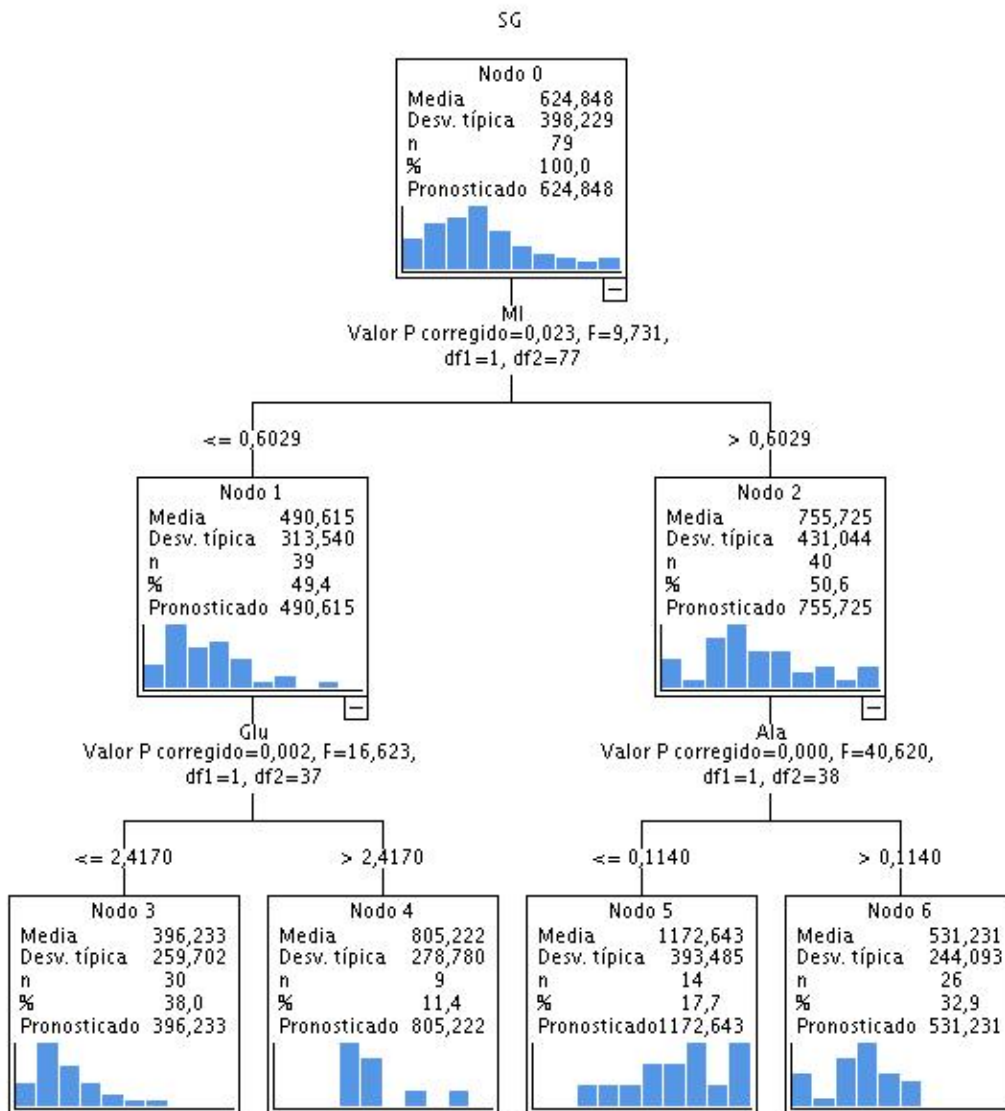


Figura 21. Árbol de clasificación y regresión metabolitos y Supervivencia Global (SG, variable continua)

La concentración de MI resultó ser la más determinante para establecer dos grupos con diferentes patrones de SG, de manera que las concentraciones bajas de este metabolito separaban correctamente los pacientes con menor SG (Nodo 1) de los que tenían mayor SG (Nodo 2).

En los nodos finales del árbol se observa que el patrón de menor supervivencia corresponde a pacientes con MI bajo, y Glu, también bajo. Las supervivencias intermedias se encuentran, o bien en situación de MI bajo y Glu alto o de MI alto pero Ala también alto. La situación más favorable se encuentra en MI alto y Ala bajo, con los puntos de corte de concentración de metabolito observados en el gráfico.

Tomando estos cuatro patrones metabólicos asociados a una determinada SG que el árbol nos discrimina, y separándolos por grado histológico (Tabla 13), se observa que la mayor parte de los casos con alta supervivencia son de grado II. Son los que se caracterizan por MI alto, y Ala baja. Además, los de corta supervivencia son en su mayoría grados IV, y se caracterizan por MI bajo, Ala alto y Glu bajo.

Tabla 13. Distribución de número de casos según grado histológico y Supervivencia Global en relación con el patrón metabólico obtenido con HRMAS.

GRADO HISTOLÓGICO	NODOS ARBOL METABLISMO-SUPERVIVENCIA				Total
	MI-Glu- media* (400)	MI+Ala+ media (530)	MI-Glu+ media (800)	MI+Ala- media (1130)	
II	0	1	0	10	11
III	2	2	1	4	9
IV	28	22	8	1	59
	30	25	9	15	79

Grupos de SG determinados por patrones metabólicos detectados en el árbol de clasificación y regresión. *Media expresada en días de Supervivencia Global.

En definitiva, cuando el tumor es más agresivo, y el grado histológico más elevado, las concentraciones de MI y Glu disminuyen, y las de Ala aumentan. Resulta necesario ahora, discriminar qué metabolitos marcan la diferencia dentro de esos grupos de SG más corta, y constituyen los mejores biomarcadores que permiten pronosticar la CSG y diferenciarla de la ISG.

Si se seleccionan únicamente los casos de grado IV, la clasificación queda como se observa en la Figura 22. Considerando ambas subpoblaciones con peor pronóstico se puede identificar al biomarcador GPC/PC como determinante para identificar casos de mayor supervivencia en un primer paso, y a la glicina en un segundo paso, ambos predicen mayor SG cuando sus valores son más altos.

Los puntos de corte de concentración de cada metabolito seleccionados por el modelo que determinan el nivel están recogidos en el gráfico. Ambos gráficos (Figuras 20 y 21) presentan puntos de corte cercanos, especialmente en MI. La bondad de clasificación global es del 78,5%, siendo equilibrada en los tres grupos de supervivencia, como indica la matriz de confusión correspondiente, comparando las SG previstas con el modelo, con los de SG de valores observados (Tabla 12).

Tabla 12. Matriz de confusión de correlaciones previstas/correctas

Supervivencia Global observada (n=79)	Predicción de Supervivencia Global			Porcentaje clasificaciones correctas
	Corta	Intermedia	Larga	
Corta (n=33)	27	6	0	81,8%
Intermedia (n=34)	6	26	2	76,5%
Larga (n=12)	1	2	9	75,0%
	43,0%	43,0%	13,9%	78,5%

Las celdas con fondo gris indican el porcentaje de clasificaciones correctas. Las celdas blancas indican las clasificaciones incorrectas. La SG observada se indica en la columna izquierda. Método de crecimiento: CRT. Variable dependiente: SG

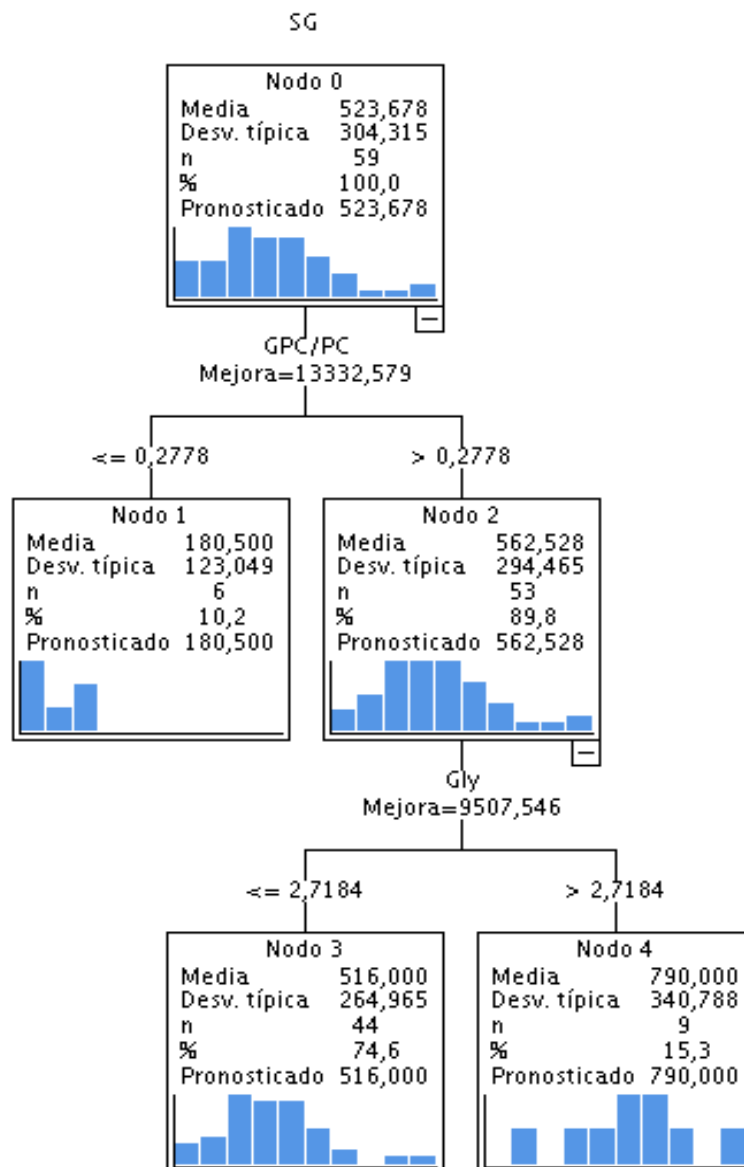


Figura 22. Árbol de clasificación y regresión de metabolitos y supervivencia global (SG, variable continua) en gliomas grado IV (n=59)

4.2.4. Genética y Supervivencia Global

Seguidamente, analizamos la correlación de la expresión génica para cada gen estudiado en número de copias y la SG de los pacientes. Como se observa en la Tabla 14, GLUD1, GLUL, HIF 2A, IGF1, PLA2G2A, SIRT1, GLS, HIK 1 y SMPD1 demostraron una asociación estadísticamente significativa con la SG ($p < 0,05$), siendo estos tres últimos aún significativos al ampliar el intervalo de confianza ($p < 0,01$). N=41.

Tabla 14. Relación entre perfiles de expresión génica y Supervivencia Global

Gen	0s	52s	104s	Mediana (sem)	p
BCAT1					0,523
[3,41e+03; 1,91e+05]	20 (100%±0%)	15 (79%±9%)	8 (42%±11%)	97	
(1,91e+05; 3,49e+06]	20 (100%±0%)	15 (88%±8%)	3 (21%±10%)	82	
CDIPT					0,593
[5,22e+03; 7,55e+04]	20 (100%±0%)	13 (76%±10%)	5 (29%±11%)	79	
(7,55e+04; 4,74e+05]	20 (100%±0%)	17 (89%±7%)	6 (35%±11%)	85	
CHKA					0,165
[1,53e+03; 2,2e+04]	20 (100%±0%)	16 (84%±8%)	5 (26%±10%)	79	
(2,2e+04; 7,01e+05]	20 (100%±0%)	14 (82%±9%)	6 (39%±12%)	97	
CS					0,965
[4,99e+04; 7,68e+06]	20 (100%±0%)	16 (84%±8%)	5 (31%±11%)	82	
(7,68e+06; 5,68e+07]	20 (100%±0%)	14 (82%±9%)	6 (35%±12%)	85	
ETNK1					0,571
[52,7; 4,24e+03]	20 (100%±0%)	14 (78%±10%)	6 (33%±11%)	81	
(4,24e+03; 9,91e+04]	20 (100%±0%)	16 (89%±7%)	5 (31%±11%)	85	
GAD1GAD25					0,991
[1,5e+03; 2,65e+04]	22 (100%±0%)	17 (89%±7%)	5 (30%±11%)	83	
(2,65e+04; 1,15e+06]	18 (100%±0%)	13 (76%±10%)	6 (35%±12%)	80	
GAD1GAD67					0,130
[26,7; 1,32e+04]	21 (100%±0%)	15 (79%±9%)	4 (24%±10%)	82	
(1,32e+04; 5,13e+05]	19 (100%±0%)	15 (88%±8%)	7 (41%±12%)	97	
GCK					0,426
[0; 682]	20 (100%±0%)	17 (94%±5%)	6 (33%±11%)	89	
(682; 1,99e+04]	20 (100%±0%)	13 (72%±11%)	5 (32%±11%)	81	
GLS					0,008**
[1,48e+04; 1,9e+05]	20 (100%±0%)	16 (80%±9%)	3 (18%±9%)	74	
(1,9e+05; 2,18e+06]	20 (100%±0%)	14 (88%±8%)	8 (50%±12%)	102	

Tabla 14. Relación entre perfiles de expresión génica y Supervivencia Global (continuación)

Gen	0s	52s	104s	Mediana (sem)	p
GLUD1					0,013*
[6,22e+03; 1,26e+05]	20 (100%±0%)	14 (78%±10%)	3 (17%±9%)	74	
(1,26e+05; 1,11e+07]	20 (100%±0%)	16 (89%±7%)	8 (48%±12%)	97	
GLUL					0,017*
[1,94e+06; 1,16e+07]	20 (100%±0%)	14 (74%±10%)	3 (16%±8%)	69	
(1,16e+07; 1,71e+08]	20 (100%±0%)	16 (94%±6%)	8 (51%±12%)	105	
GLUT2					0,598
[0; 0,1]	23 (100%±0%)	16 (76%±9%)	7 (33%±10%)	80	
(0,1; 2,2e+04]	17 (100%±0%)	14 (93%±6%)	4 (30%±12%)	85	
GLPD1					0,408
[80,9; 3,79e+04]	22 (100%±0%)	17 (85%±8%)	5 (29%±10%)	80	
(3,79e+04; 4,04e+05]	18 (100%±0%)	13 (81%±10%)	6 (38%±12%)	91	
GPT					0,064
[800; 1,09e+04]	22 (100%±0%)	17 (89%±7%)	8 (46%±12%)	94	
(1,09e+04; 2,12e+06]	18 (100%±0%)	13 (76%±10%)	3 (18%±9%)	79	
HIF1A					0,404
[123; 2,37e+07]	20 (100%±0%)	15 (79%±9%)	5 (26%±10%)	82	
(2,37e+07; 2,9e+08]	20 (100%±0%)	15 (88%±8%)	6 (40%±12%)	85	
HIF2A					0,029*
[9,53e+03; 1,69e+05]	20 (100%±0%)	13 (72%±11%)	3 (20%±10%)	69	
(1,69e+05; 5,81e+06]	20 (100%±0%)	17 (94%±5%)	8 (44%±12%)	96	
HIF3A					0,162
[1,15e+03; 6,19e+04]	20 (100%±0%)	15 (83%±9%)	4 (22%±10%)	80	
(6,19e+04; 8,4e+05]	20 (100%±0%)	15 (83%±9%)	7 (43%±12%)	85	
HIK1					0,007**
[1,77e+04; 4,04e+05]	20 (100%±0%)	13 (72%±11%)	3 (17%±9%)	74	
(4,04e+05; 2,03e+06]	20 (100%±0%)	17 (94%±5%)	8 (49%±12%)	97	
HK2					0,299
[2,24e+04; 1,32e+05]	20 (100%±0%)	15 (83%±9%)	5 (28%±11%)	80	
(1,32e+05; 2,29e+06]	20 (100%±0%)	15 (83%±9%)	6 (37%±12%)	85	
HK3					0,364
[1,82e+03; 2,25e+04]	20 (100%±0%)	14 (82%±9%)	7 (41%±12%)	85	
(2,25e+04; 1,06e+06]	20 (100%±0%)	16 (84%±8%)	4 (24%±10%)	82	
IGFBP1					0,478
[1,89; 683]	21 (100%±0%)	16 (76%±9%)	6 (32%±10%)	80	
(683; 4,3e+04]	19 (100%±0%)	14 (93%±6%)	5 (33%±12%)	85	
IGF1					0,024*
[16; 520]	22 (100%±0%)	16 (80%±9%)	4 (20%±9%)	74	
(520; 2,13e+04]	18 (100%±0%)	14 (88%±8%)	7 (49%±13%)	97	
IGF1R					0,554
[6,47e+03; 1,93e+06]	20 (100%±0%)	15 (79%±9%)	5 (26%±10%)	82	
(1,93e+06; 2,93e+08]	20 (100%±0%)	15 (88%±8%)	6 (40%±12%)	94	

Tabla 14. Relación entre perfiles de expresión génica y Supervivencia Global (continuación)

Gen	0s	52s	104s	Mediana (sem)	p
INSR					0,133
[9,87; 28,5]	20 (100%±0%)	14 (74%±10%)	5 (26%±10%)	80	
(28,5; 6,63e+03]	20 (100%±0%)	16 (94%±6%)	6 (39%±12%)	97	
ISYNA1					0,449
[6,06e+04; 2,57e+05]	20 (100%±0%)	14 (82%±9%)	4 (28%±11%)	69	
(2,57e+05; 9,9e+06]	20 (100%±0%)	16 (84%±8%)	7 (37%±11%)	85	
TP53					0,603
[4,57e+05; 2,11e+06]	20 (100%±0%)	14 (82%±9%)	6 (35%±12%)	83	
(2,11e+06; 1,63e+07]	20 (100%±0%)	16 (84%±8%)	5 (30%±11%)	82	
PC					0,293
[5,03e+03; 1,72e+05]	20 (100%±0%)	12 (71%±11%)	5 (29%±11%)	69	
(1,72e+05; 1,69e+06]	20 (100%±0%)	18 (95%±5%)	6 (35%±11%)	94	
PCYT1A					0,357
[1,04e+05; 7,01e+05]	20 (100%±0%)	15 (83%±9%)	5 (33%±11%)	74	
(7,01e+05; 7,81e+06]	20 (100%±0%)	15 (83%±9%)	6 (33%±11%)	89	
PDE1A					0,223
[875; 3,39e+04]	22 (100%±0%)	18 (90%±7%)	5 (25%±10%)	81	
(3,39e+04; 1,55e+06]	18 (100%±0%)	12 (75%±11%)	6 (42%±13%)	97	
PDHA1					0,733
[4,05e+05; 1,48e+06]	20 (100%±0%)	16 (80%±9%)	5 (29%±10%)	80	
(1,48e+06; 1,17e+07]	20 (100%±0%)	14 (88%±8%)	6 (38%±12%)	89	
PDHA2					0,276
[90,8; 5,87e+04]	22 (100%±0%)	17 (89%±7%)	7 (41%±12%)	94	
(5,87e+04; 5,07e+06]	18 (100%±0%)	13 (76%±10%)	4 (24%±10%)	80	
PDK1					0,086
[1,15e+05; 5,45e+05]	20 (100%±0%)	14 (74%±10%)	4 (21%±9%)	79	
(5,45e+05; 2,48e+06]	20 (100%±0%)	16 (94%±6%)	7 (45%±12%)	97	
PFKM					0,887
[2e+04; 1,96e+06]	20 (100%±0%)	16 (84%±8%)	6 (36%±11%)	80	
(1,96e+06; 4,18e+07]	20 (100%±0%)	14 (82%±9%)	5 (29%±11%)	85	
PKM					0,511
[7,88e+06; 2e+07]	20 (100%±0%)	14 (74%±10%)	5 (31%±11%)	69	
(2e+07; 5,49e+08]	20 (100%±0%)	16 (94%±6%)	6 (35%±12%)	85	
PLA2G2A					0,035*
[46,8; 1,21e+05]	20 (100%±0%)	14 (88%±8%)	8 (50%±12%)	101	
(1,21e+05; 9,29e+06]	20 (100%±0%)	16 (80%±9%)	3 (18%±9%)	74	
PLCG1					0,823
[1,49e+05; 1,74e+06]	20 (100%±0%)	14 (78%±10%)	6 (39%±11%)	80	
(1,74e+06; 1,1e+07]	20 (100%±0%)	16 (89%±7%)	5 (28%±11%)	85	
SHMT1					0,352
[1,01e+03; 1,96e+04]	20 (100%±0%)	13 (72%±11%)	5 (28%±11%)	74	
(1,96e+04; 1,02e+06]	20 (100%±0%)	17 (94%±5%)	6 (37%±12%)	85	

Tabla 14. Relación entre perfiles de expresión génica y Supervivencia Global (continuación)

Gen	0s	52s	104s	Mediana (sem)	p
SIRT1					0,017*
[6,18e+04; 3,89e+05]	20 (100%±0%)	14 (78%±10%)	3 (21%±10%)	69	
(3,89e+05; 1,21e+07]	20 (100%±0%)	16 (89%±7%)	8 (44%±12%)	96	
SLC6A1					0,696
[1,53e+04; 1,03e+06]	20 (100%±0%)	15 (88%±8%)	3 (21%±10%)	82	
(1,03e+06; 3,63e+07]	20 (100%±0%)	15 (79%±9%)	8 (42%±11%)	85	
SLC6A17					0,083
[4,89e+03; 7,06e+04]	21 (100%±0%)	17 (85%±8%)	4 (23%±10%)	74	
(7,06e+04; 1,56e+06]	19 (100%±0%)	13 (81%±10%)	7 (44%±12%)	91	
SMPD1					0,006**
[3,35e+05; 1,12e+06]	20 (100%±0%)	13 (76%±10%)	2 (16%±9%)	66	
(1,12e+06; 1,03e+07]	20 (100%±0%)	17 (89%±7%)	9 (47%±11%)	97	
LDHA					0,612
[2,44e+05; 1,28e+06]	20 (100%±0%)	15 (88%±8%)	6 (35%±12%)	80	
(1,28e+06; 2,16e+07]	20 (100%±0%)	15 (79%±9%)	5 (29%±11%)	85	
LDHB					0,224
[4,3e+04; 5,37e+05]	20 (100%±0%)	16 (84%±8%)	4 (25%±10%)	82	
(5,37e+05; 9,21e+07]	20 (100%±0%)	14 (82%±9%)	7 (41%±12%)	94	

*Número de pacientes vivos al final del periodo de estudio (0, 52 y 104 semanas).

* Correlación significativa bilateral <0,05. ** Correlación significativa bilateral <0,01

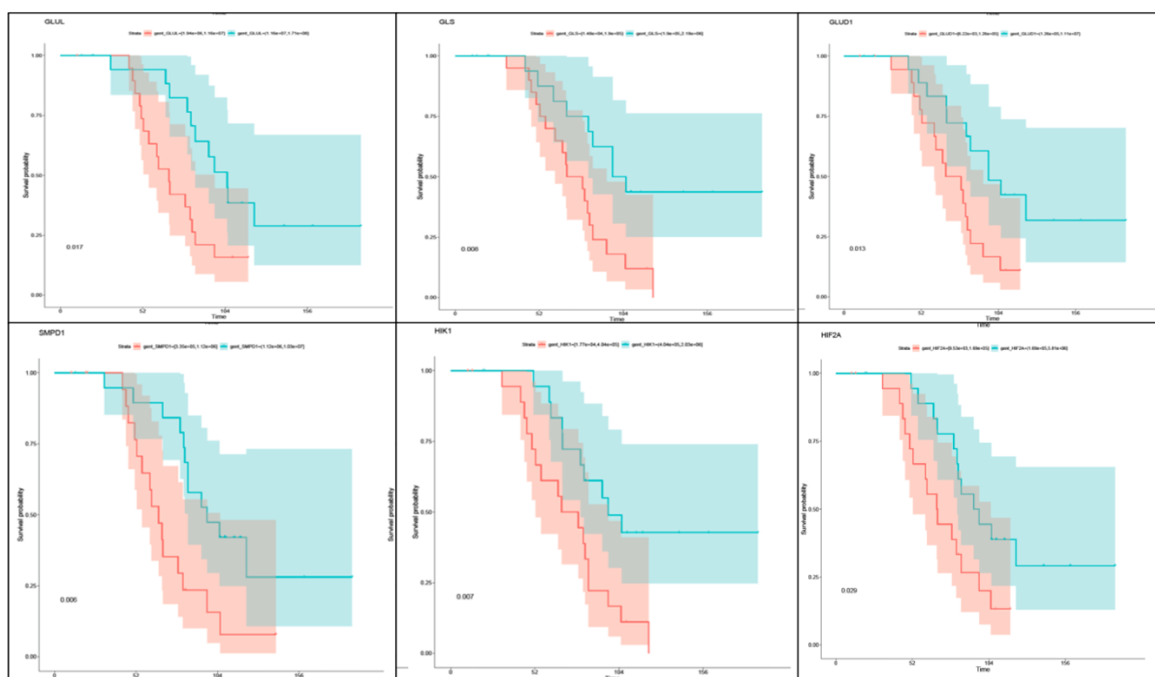


Figura 23. Curvas Kaplan-Meier de Supervivencia Global y expresión génica ($p < 0.01$ en el test de log-rank /Breslow). A. GLUL, glutamina sintasa; B. GLS, glutaminasa; C. glutamato deshidrogenasa D. HK1, hexokinasa 1; E. SMPD1, esfinomielifosfodiesterasa 1; F. factor inducible de hipoxia 1

La Figura 23 muestra gráficos Kaplan-Meier ilustrando las diferencias de SG entre grupos divididos por la mediana.

Con el objetivo de encontrar asociaciones entre el perfil mutacional IDH1 y otros perfiles genéticos, comparamos la expresión de cada gen entre los pacientes IDH1 mutados, e IDH1 wild-type, para todos los grados histológicos (Tabla 15).

Tabla 15. Relación entre perfiles de expresión génica y perfil mutacional IDH1

GEN	Wild-type	IDH mutado	p
n	34	7	
BCAT1	5,06e+05±1,35e+05	1,50e+05±1,35e+05	0,029*
CDIPT	1,14e+05±1,81e+04	1,73e+05±1,81e+04	0,434
CHKA	5,59e+04±2,12e+04	1,58e+05±2,12e+04	0,218
CS	1,27e+07±2,22e+06	1,81e+07±2,22e+06	0,449
ETNK1	8,63e+03±2,80e+03	2,21e+04±2,80e+03	0,345
GAD1GAD25	1,00e+05±3,73e+04	5,02e+04±3,73e+04	0,306
GAD1GAD67	4,79e+04±1,53e+04	1,24e+05±1,53e+04	0,325
GCK	3,57e+03±9,64e+02	7,20e+02±9,64e+02	0,006**
GLS	3,33e+05±7,71e+04	9,16e+05±7,71e+04	0,105
GLUD1	4,81e+05±3,33e+05	2,01e+06±3,33e+05	0,278
GLUL	1,65e+07±5,05e+06	3,92e+07±5,05e+06	0,350
GLUT2	1,14e+03±7,59e+02	1,88e+02±7,59e+02	0,225
GLPD1	6,44e+04±1,34e+04	5,98e+04±1,34e+04	0,855
GPT	1,11e+05±6,58e+04	5,49e+03±6,58e+04	0,120
HIF1A	2,51e+07±3,76e+06	7,34e+07±3,76e+06	0,248
HIF2A	4,84e+05±1,81e+05	2,56e+05±1,81e+05	0,281
HIF3A	1,73e+05±4,06e+04	2,12e+05±4,06e+04	0,748
HIK1	4,92e+05±7,01e+04	6,71e+05±7,01e+04	0,496
HK2	3,01e+05±7,36e+04	3,02e+05±7,36e+04	0,993
HK3	8,24e+04±3,23e+04	2,95e+04±3,23e+04	0,143
IGFBP1	4,55e+03±1,75e+03	6,20e+03±1,75e+03	0,691
IGF1	1,88e+03±6,94e+02	5,43e+03±6,94e+02	0,258
IGF1R	1,27e+07±8,83e+06	6,88e+06±8,83e+06	0,535
INSR	6,70e+02±2,88e+02	1,02e+03±2,88e+02	0,602
ISYNA1	1,08e+06±3,92e+05	2,31e+05±3,92e+05	0,042*
TP53	3,09e+06±6,22e+05	3,89e+06±6,22e+05	0,683
PC	3,03e+05±6,31e+04	5,86e+05±6,31e+04	0,246
PCYT1A	9,73e+05±2,29e+05	1,83e+06±2,29e+05	0,390
PDE1A	1,05e+05±4,97e+04	2,83e+05±4,97e+04	0,376
PDHA1	2,22e+06±4,37e+05	2,78e+06±4,37e+05	0,641
PDHA2	5,21e+05±2,06e+05	1,09e+05±2,06e+05	0,64
PDK1	7,09e+05±1,00e+05	9,60e+05±1,00e+05	0,278
PFKM	4,14e+06±1,38e+06	6,53e+06±1,38e+06	0,485
PKM	4,41e+07±1,68e+07	2,86e+07±1,68e+07	0,443
PLA2G2A	9,45e+05±3,44e+05	3,00e+05±3,44e+05	0,110
PLCG1	2,48e+06±4,27e+05	2,76e+06±4,27e+05	0,841
SHMT1	5,37e+04±2,83e+04	1,75e+05±2,83e+04	0,428
SIRT1	1,03e+06±4,02e+05	3,34e+06±4,02e+05	0,186
SLC6A1	3,23e+06±1,35e+06	7,03e+05±1,35e+06	0,720
SLC6A17	2,25e+05±6,58e+04	3,32e+05±6,58e+04	0,551
SMPD1	1,91e+06±3,79e+05	2,45e+06±3,79e+05	0,694
LDHA	2,44e+06±8,38e+05	3,85e+06±8,38e+05	0,620
LDHB	4,26e+06±2,60e+06	2,21e+07±2,60e+06	0,258

* Correlación significativa bilateral <0,05

** Correlación significativa bilateral <0,01

Posteriormente seleccionamos sólo los glioblastomas para analizar la correlación entre los perfiles genéticos y la SG (Tabla 16).

Tabla 16. Relación entre perfiles de expresión génica y supervivencia global en glioblastomas IDH mutados y wild-type

Gen	0s	52s	104s	Mediana (sem)	p
GAD1GAD67					0,073
[26,7; 1,29e+04]	16 (100%±0%)	11 (73%±11%)	2 (17%±10%)	69	
(1,29e+04; 4,01e+05]	16 (100%±0%)	13 (87%±9%)	7 (47%±13%)	97	
GCK					0,068
[0; 682]	16 (100%±0%)	13 (93%±7%)	6 (43%±13%)	96	
(682; 1,99e+04]	16 (100%±0%)	11 (69%±12%)	3 (23%±11%)	75	
GLS					0,061
[1,48e+04; 1,7e+05]	16 (100%±0%)	12 (75%±11%)	3 (23%±11%)	68	
(1,7e+05; 1,7e+06]	16 (100%±0%)	12 (86%±9%)	6 (43%±13%)	91	
GLUD1					0,042*
[6,22e+03; 1,23e+05]	16 (100%±0%)	11 (79%±11%)	2 (14%±9%)	80	
(1,23e+05; 9,45e+06]	16 (100%±0%)	13 (81%±10%)	7 (49%±13%)	97	
GLUL					0,002**
[1,94e+06; 1,06e+07]	16 (100%±0%)	10 (67%±12%)	1 (7%±6%)	62	
(1,06e+07; 1,7e+08]	16 (100%±0%)	14 (93%±6%)	8 (59%±13%)	106	
HIF3A					0,003**
[1,77e+04; 3,8e+05]	16 (100%±0%)	10 (67%±12%)	2 (13%±9%)	66	
(3,8e+05; 1,97e+06]	16 (100%±0%)	14 (93%±6%)	7 (52%±13%)	106	
HIK1					0,028*
[2,24e+04; 1,38e+05]	16 (100%±0%)	12 (75%±11%)	3 (19%±10%)	74	
(1,38e+05; 2,29e+06]	16 (100%±0%)	12 (86%±9%)	6 (48%±14%)	94	
TP53					0,074
[5,03e+03; 1,58e+05]	16 (100%±0%)	9 (64%±13%)	3 (21%±11%)	64	
(1,58e+05; 1,69e+06]	16 (100%±0%)	15 (94%±6%)	6 (42%±13%)	94	
PC					0,080
[1,04e+05; 6,63e+05]	16 (100%±0%)	12 (80%±10%)	3 (27%±11%)	69	
(6,63e+05; 7,05e+06]	16 (100%±0%)	12 (80%±10%)	6 (40%±13%)	94	
PDHA2					0,058
[1,15e+05; 6,08e+05]	16 (100%±0%)	11 (69%±12%)	3 (19%±10%)	74	
(6,08e+05; 2,48e+06]	16 (100%±0%)	13 (93%±7%)	6 (48%±14%)	94	
SHMT1					0,002**
[6,18e+04; 3,65e+05]	16 (100%±0%)	11 (73%±11%)	2 (13%±9%)	66	
(3,65e+05; 1,09e+07]	16 (100%±0%)	13 (87%±9%)	7 (51%±13%)	106	
SLC6A1					0,043*
[4,89e+03; 6,27e+04]	16 (100%±0%)	12 (80%±10%)	2 (13%±9%)	69	
(6,27e+04; 1,56e+06]	16 (100%±0%)	12 (80%±10%)	7 (53%±13%)	105	
SLC6A17					0,003**
[3,35e+05; 1,09e+06]	16 (100%±0%)	10 (71%±12%)	1 (11%±9%)	64	
(1,09e+06; 9,73e+06]	16 (100%±0%)	14 (88%±8%)	8 (50%±12%)	100	

Solamente genes significativos, o en el borde, de la significación estadística. *Número de pacientes vivos al final del periodo de estudio (0, 52 y 104 semanas)

* **Correlación significativa bilateral <0,05.** ** **Correlación significativa bilateral <0,01**

Puesto que el proceso de tumorigénesis de los gliomas grado IV primarios y secundarios presenta diferencias analizamos por separado la asociación estadística entre los dos tipos de glioma y los diferentes perfiles genéticos.

Recordemos aquí que en los gliomas secundarios la mutación IDH1 interviene procesos que no se dan en los wild-type como la conversión del alfa-cetoglutarato al oncometabolito 2-HG y que en los glioblastomas secundarios se encuentran algunas mutaciones de forma más frecuente.

Tabla 17. Relación de perfiles de expresión génica y supervivencia global en glioblastomas exclusivamente wild-type.

Gen	0s	52s	104s	Mediana (sem)	p
GLUL					0,010*
[1,94e+06; 9,86e+06]	14 (100%±0%)	8 (62%±13%)	1 (8%±7%)	56	
(9,86e+06; 4,77e+07]	14 (100%±0%)	12 (92%±7%)	5 (38%±13%)	94	
HIK1					0,093
[1,77e+04; 3,5e+05]	14 (100%±0%)	10 (71%±12%)	2 (14%±9%)	73	
(3,5e+05; 1,28e+06]	14 (100%±0%)	10 (83%±11%)	4 (33%±14%)	83	
PDK1					0,099
[1,15e+05; 5,04e+05]	14 (100%±0%)	9 (64%±13%)	2 (14%±9%)	65	
(5,04e+05; 2,48e+06]	14 (100%±0%)	11 (92%±8%)	4 (33%±14%)	85	
SIRT1					0,093
[6,18e+04; 2,73e+05]	14 (100%±0%)	9 (69%±13%)	2 (15%±10%)	66	
(2,73e+05; 6,23e+06]	14 (100%±0%)	11 (85%±10%)	4 (31%±13%)	85	
SMPD1					0,001**
[3,35e+05; 1,09e+06]	14 (100%±0%)	8 (67%±14%)	0 (0%±NaN%)	59	
(1,09e+06; 7,31e+06]	14 (100%±0%)	12 (86%±9%)	6 (43%±13%)	89	

Solamente se recogen genes significativos o en el borde de la significación estadística.*Número de pacientes vivos al final del periodo de estudio (0, 52 y 104 semanas).

* **Correlación significativa bilateral <0,05**

** **Correlación significativa bilateral <0,01**

4.2.5. Interactómica

Los análisis de este apartado utilizan los conjuntos de datos completos del metaboloma tumoral y perfiles de expresión génica de 41 biopsias. Con el objeto de poder comparar los datos metabólicos y genéticos, como paso previo a los siguientes análisis, se realizó una estandarización por muestra y por sistema (valor de cada metabolito o copias del gen dividido por la suma del valor de concentración de todos los metabolitos o copias de todos los genes analizados respectivamente). Posteriormente se mostrará gráficamente la necesidad de estandarización (véase Figuras 29 y 30). Los análisis realizados en este apartado nos han permitido estudiar la variabilidad de los datos, extraer información sobre la existencia de subgrupos, y establecer las correlaciones entre las diferentes variables.

Una primera aproximación para una visualización de datos inicial y para conocer la relación entre todas las variables biomoleculares, metabólicas y génicas empezamos el análisis interactómico realizando un **análisis de componentes principales (ACP)**. Se trata de una técnica de aprendizaje no supervisado que reduce el número de variables disponibles en varios componentes principales no correlacionados entre sí tratando de explicar la mayor variabilidad posible de la muestra y que permitieron posteriormente la clasificación de las muestras según el estado de la mutación IDH.

En la figura 24 se han utilizado los dos primeros componentes principales obtenidos a partir de nuestra matriz de datos para clasificar las muestras según el estado de la mutación IDH1/2, observándose una clara agrupación de los tumores IDH mutados. Existen dos posibles *outliers* que serán explicados más adelante en la Figura 31. Observamos cómo tanto los tumores IDH-mutados como los wild-type se agrupan en los cuadrantes superiores izquierdos, presentando por lo tanto una alta correlación con el eje de ordenadas. Esto significa que los tumores con una evolución menos agresiva (IDH-mutados) pueden ser bien diferenciados en función de su perfil metabólico y perfil de expresión de los genes relacionados con el metabolismo tumoral utilizados en el presente trabajo. Esto sugiere que las diferencias en su comportamiento clínico responden a cambios profundos en su comportamiento metabólico y genético.

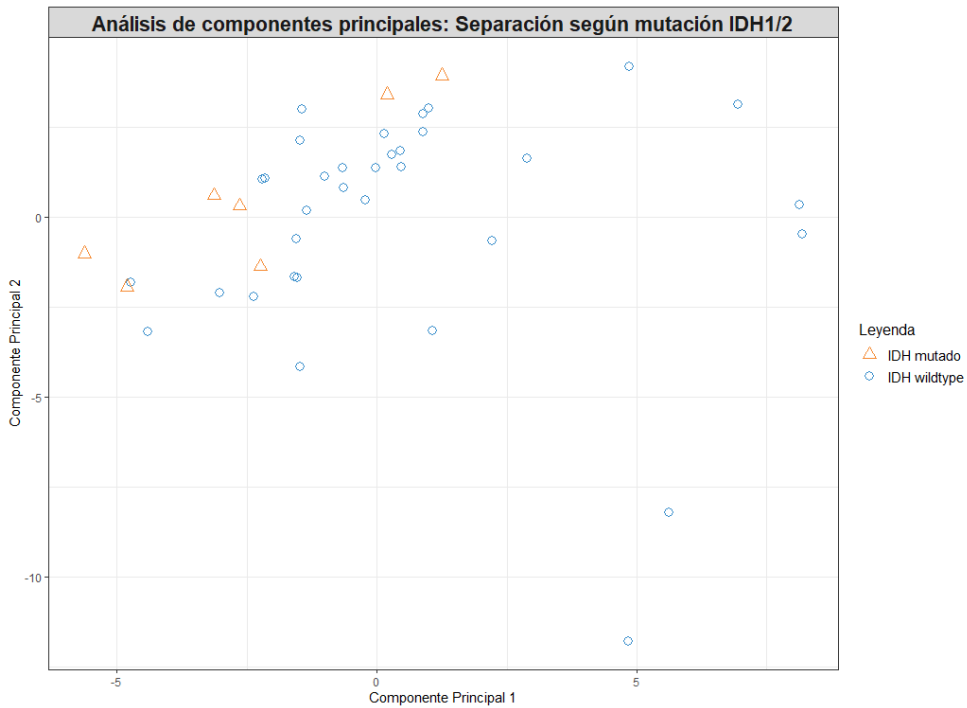


Figura 24. Análisis de componentes principales (ACP) incluyendo todas las variables espectroscópicas y genéticas en relación al estado de la mutación IDH1/2. Clasificación de los tumores según su mutación IDH utilizando los dos primeros componentes principales.

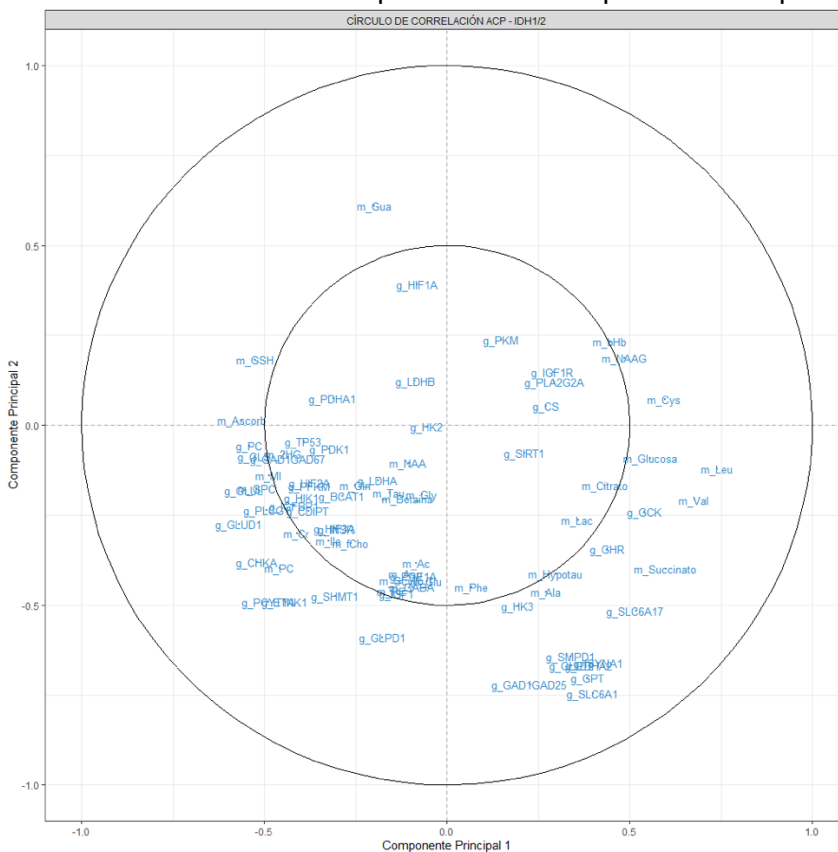


Figura 25. Análisis de componentes principales (ACP) incluyendo todas las variables espectroscópicas (m) y genéticas (g), en relación a la mutación IDH1. Círculo de correlación que muestra la relación de todas las variables con los dos primeros componentes principales utilizados en la clasificación de los tumores según el estado de su mutación IDH.

La Figura 25 muestra el resultado del ACP incluyendo todas las variables metabólicas y genéticas en relación a la clasificación realizada del estado de la mutación IDH. La correlación de las variables con cada uno de los dos primeros componentes principales es positiva cuando se aproximan a 1 y, negativa, al -1, en cada eje. Estos componentes explican aproximadamente un 25% de la variabilidad de nuestra población. Cada componente principal incluye una combinación lineal de las variables originales no correlacionadas entre sí. En esta figura, el gráfico de correlación ayuda a interpretar cuáles son las variables que están más representadas en cada componente principal, y, por tanto, aquéllas que tienen mayor relevancia para la clasificación de los tumores según su estado de mutación IDH. Los círculos concéntricos representan la intensidad de la correlación, siendo el círculo más externo correspondiente a un índice de correlación de Pearson de 1 y el intermedio, de 0,5. De este modo, las variables que se encuentran entre el primer y segundo círculos aquéllas con una correlación de 0,5 a 1, como por ejemplo, la expresión del gen de la GCK, relacionado positivamente con el primer componente principal o la expresión del gen GLUD1 relacionada negativamente tanto con el primero como con el segundo componente principal.

Es notable la asociación positiva en el eje de abscisas con el componente 1 de SLC6A1, SMPD1, ISYNA1, GAD1GAD25, GPT, genes que se agrupan en el gráfico y cuya sobreexpresión también se asoció a una SG más larga. También SLC6A17 y GCK muestran una asociación positiva. Sin embargo, la concentración del metabolito PC que mostró tener relación negativa con la SG, también muestra una relación negativa, siendo este hallazgo coherente por tanto con nuestros resultados. Otros oncogenes como CHKA o ETNK1 que no mostraron relación con la SG en nuestro estudio muestran correlación negativa con IDH1 en el eje de abscisas. En el eje de ordenadas, Gly, Cho, PC, GPC y MI muestran alta correlación con el componente 2. Nótese que todos los metabolitos seleccionados han sido también previamente seleccionados por los árboles de clasificación y regresión como significativos. GLUD1, uno de los genes cuya sobreexpresión se demostró asociada positivamente con la SG, fue también seleccionado por el ACP.

Otro procedimiento de análisis muy útil fueron los **mapas de correlación**, que ayudaron a identificar potenciales asociaciones entre perfiles de expresión

génica y metabolitos y a interpretar los resultados, así como a detectar posibles “puntos calientes” que ayudan a establecer relaciones potenciales entre ambos sistemas para la identificación de biomarcadores importantes. La intensidad del color en cada punto del gráfico marca el grado de asociación, donde los círculos representados con color más oscuro, indican que la asociación es más alta. El color de cada punto marca la correlación positiva (azul) o negativa (rojo) (figuras 26-28). Es importante resaltar que no es posible inferir una relación causal a partir de estos gráficos, y que la correlación puede significar también que las variables se mueven juntas en una misma o diferentes direcciones por causas diferentes y ajenas entre sí.

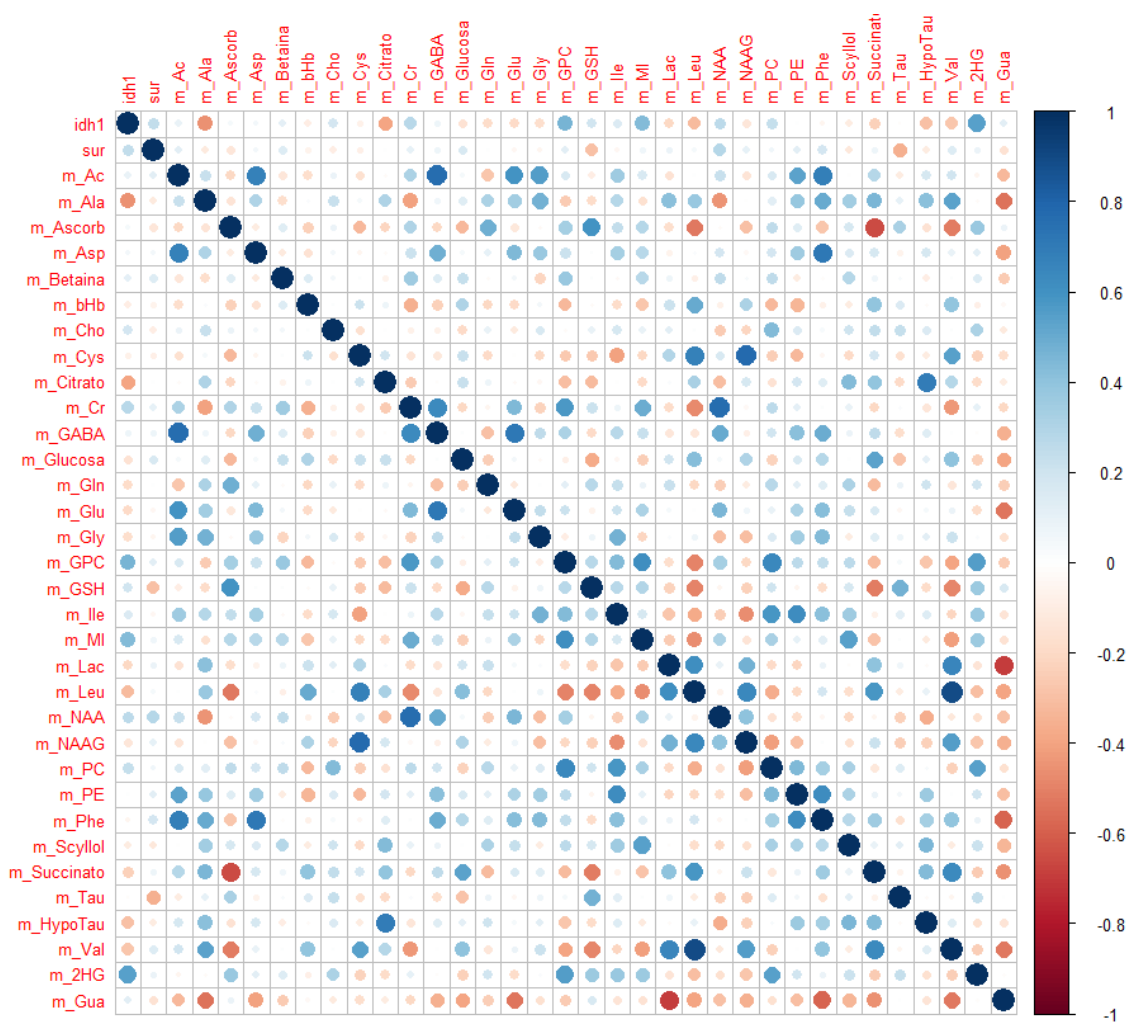


Figura 26. Mapa de correlaciones del metaboloma tumoral. Las dos primeras filas y columnas indican la mutación IDH1 (presencia: 1, ausencia: 0) y la Supervivencia Global medida como variable continua. Se muestra una asociación positiva (azul) o negativa (rojo).

En esta primera aproximación sacamos resultados congruentes con nuestros hallazgos descritos previamente en el estudio metabolómico de

supervivencia. Entre las asociaciones más relevantes, destaca la correlación positiva entre la concentración tumoral de Alanina con la de Lactato, medidos por HRMAS. Previamente habíamos descrito la relación de estos metabolitos con los tumores de menor supervivencia. Asimismo, la Alanina se relaciona negativamente en este mapa con patrones metabólicos de menor agresividad como la el NAA y la presencia de la mutación IDH1.

La concentración de GPC se relaciona positivamente con la presencia de la mutación IDH1, 2-HG que es el producto de la presencia de dicha mutación e Inositol. En conclusión, se relaciona con un patrón de menor agresividad tumoral. Asimismo, se relaciona con PC, lo cual es lógico, ya que ambos forman parte del metabolismo fosfolipídico, y ambos se elevan al encontrarse activa dicha vía.

Estos resultados nos permiten validar nuestros hallazgos metabólicos a partir de los estudios retrospectivo y prospectivo.

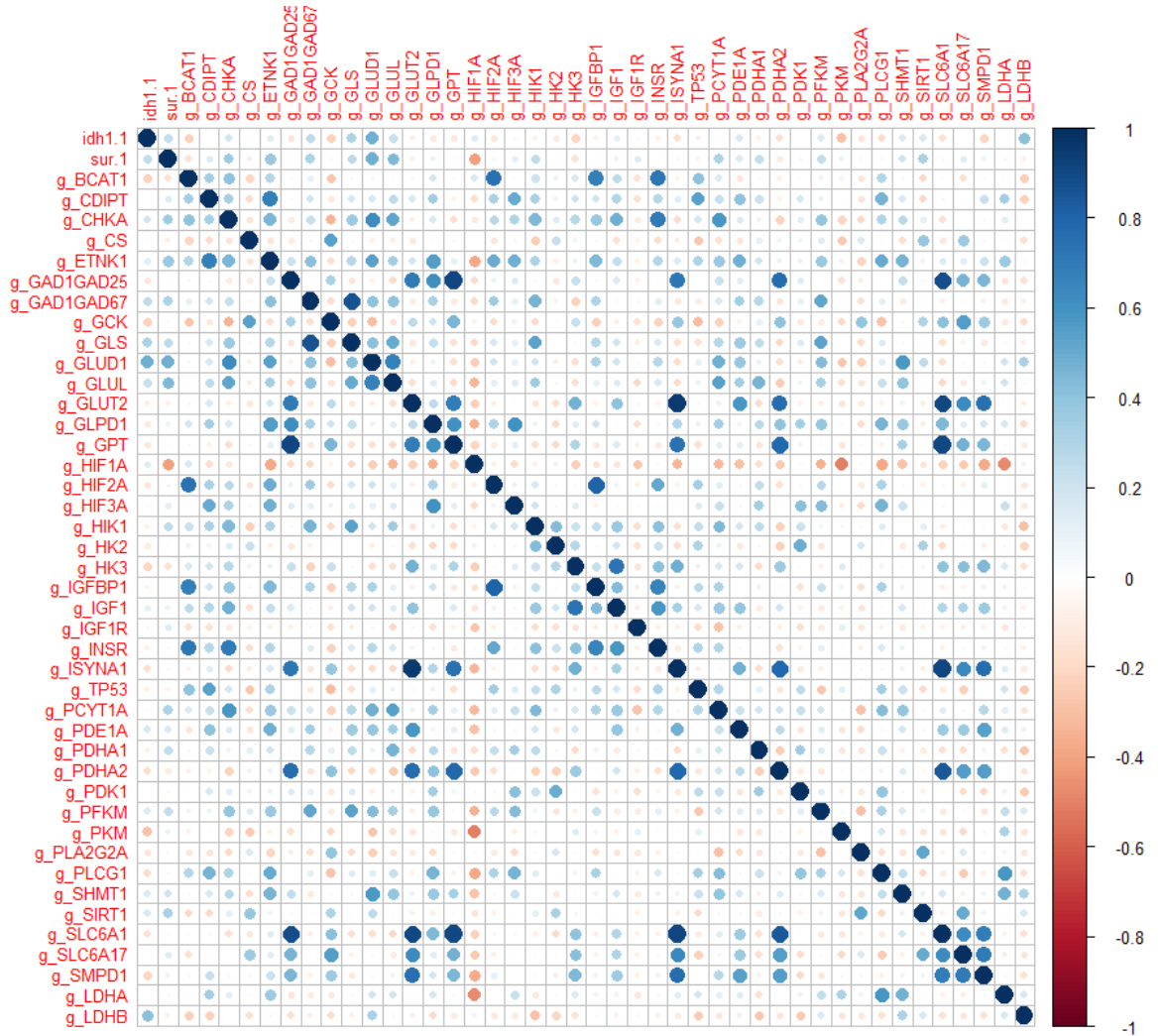


Figura 27. Mapa de correlaciones de los perfiles génicos. Las dos primeras filas y columnas indican la mutación IDH1 (presencia: 1, ausencia: 0 y la Supervivencia Global en términos absolutos.

Al observar la figura 27 encontramos correlaciones positivas fundamentalmente, de forma que en los genes la sobreexpresión de unos se asocia a la sobreexpresión de otros, formando patrones probablemente oncogénicos u oncosupresores. Encontramos por ejemplo, asociación entre IGF1 y HIF2A, ambos relacionados con la SG en Tabla 14. También encontramos relación positiva entre SMPD1 e ISYNA1, el primero relacionado con la SG en gliomas y el segundo con la SG en glioblastomas wild-type (tablas 14 y 17, respectivamente).

De este gráfico podemos concluir que los genes al igual que los metabolitos se agrupan en patrones que merecerían ser fruto de futuros estudios genéticos en gliomas.

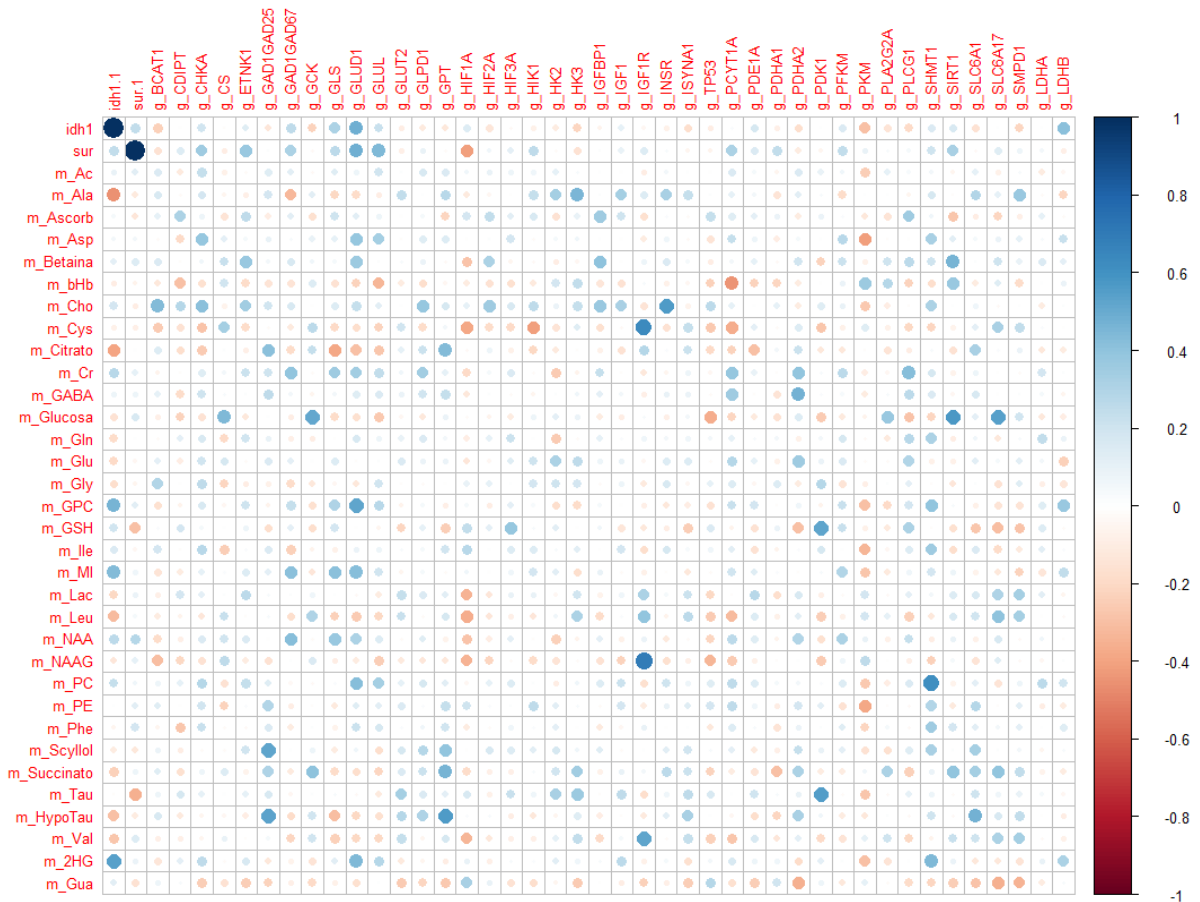


Figura 28. Mapa de correlaciones interactómico, correlaciona expresión génica y metabólica. Muestra asociación positiva (azul) o negativa (rojo).

Esta exploración final muestra la intensidad de correlación entre las concentraciones de los metabolitos medidos por HRMAS y los perfiles de expresión génica. Notablemente, una mayor expresión del gen GLUD1 se relaciona con mayor SG, y con mayores concentraciones de GPC, IDH1, 2-HG y *myo*-Inositol (MI). Una mayor expresión de SHMT1 se correlaciona con PC y

GPC de forma positiva indicando posiblemente que la glicina obtenida a través de la SHMT1 es utilizada para el metabolismo fosfolipídico.

Otras correlaciones como la de glucosa con GCK y GLUD1 serían esperables por ser parte de la misma vía metabólica. Sin embargo, su correlación con SIRT1 y SLC6A17 serían de interés en futuros estudios.

Gracias a la matriz de correlaciones obtenida para la realización de las figuras anteriores, se han elaborado gráficos de **redes de correlaciones** con el objeto de resaltar aquellos subgrupos de variables metabólicas y genéticas. Aprovechamos estos gráficos para demostrar la necesidad de estandarización de las variables tal y como se ha explicado previamente, sin la cual la comparación de ambos sistemas hubiera sido imposible.

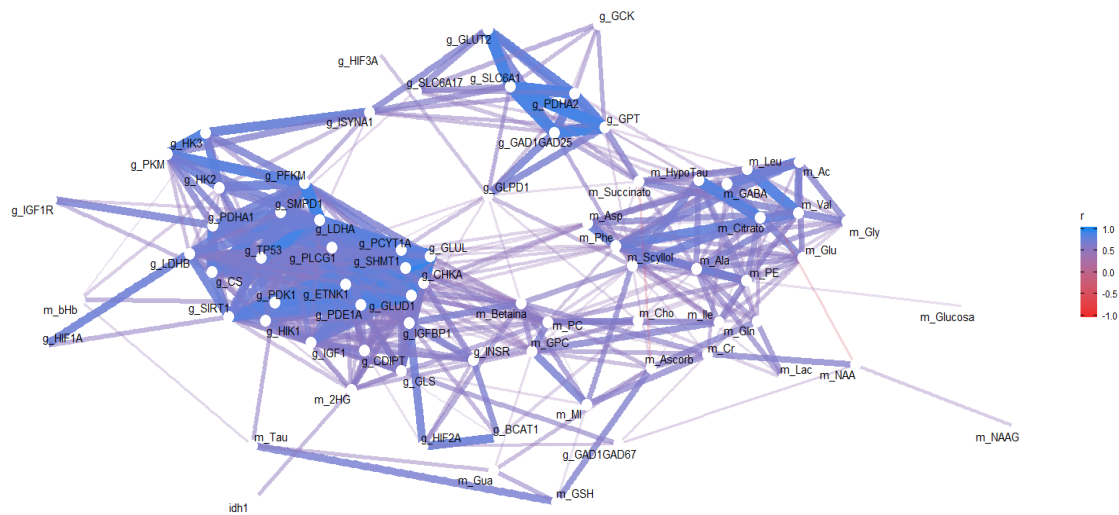


Figura 29. Red de correlaciones interactómica previa a la normalización de los valores de expresión génica y metabólicos.

La red de correlación muestra las variables ordenadas por proximidad según la intensidad de la correlación. Las líneas más gruesas y cortas corresponden a correlaciones más intensas y las más largas y finas muestran relaciones más débiles. El código de colores indica la dirección de la correlación. De este modo, se identifican agrupaciones de metabolitos y genes, muchos de ellos relacionados de forma independiente con la supervivencia. En la Figura 29, realizada con la matriz de correlación de Pearson a partir de las variables no estandarizadas, se observa cómo las variables genéticas y metabólicas se agrupan en fundamentalmente dos grupos bien separados entre sí, lo que hace

imposible discernir entre las asociaciones relevantes existentes entre ambos sistemas metabólico y genético.

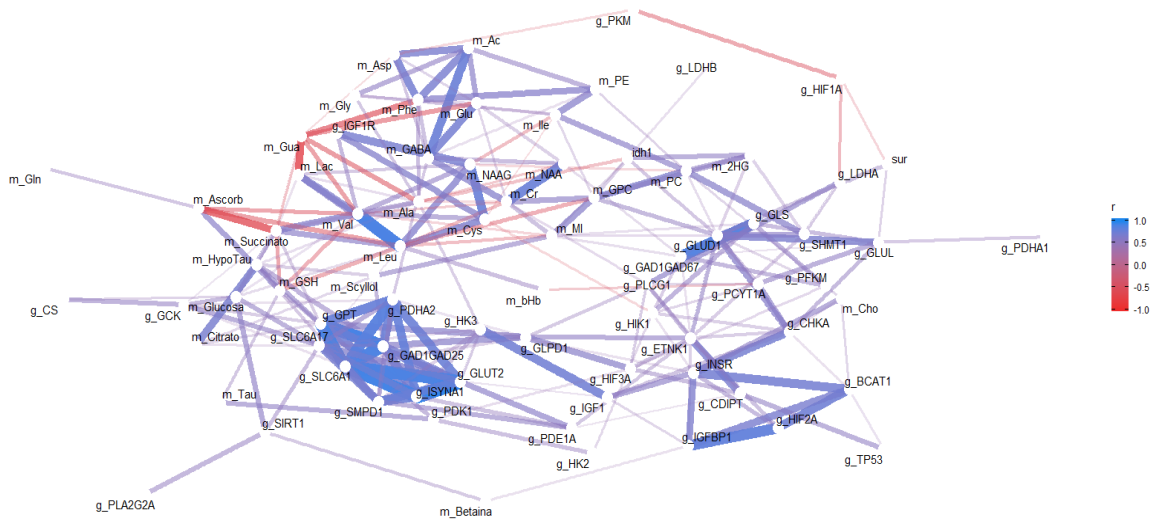


Figura 30. Red de correlaciones interactómica tras normalización de los valores de expresión génica y metabólicos.

La Figura 30 ha sido realizada tras la normalización de las variables, pudiéndose observar de esta forma la verdadera relación entre los sistemas de una forma más visual, puesto así en el mismo “nivel”. A pesar de que en este gráfico destaca aún una mayor fuerza de asociaciones entre las variables dentro de un mismo sistema de expresión génica o metabólico, sí demuestra que la estandarización separa mejor las variables y hace posible la realización del cuadro de correlaciones intersistema mostrado previamente en la Figura 28.

En esta Figura 30, se agrupan ahora variables genéticas y metabólicas que cambian juntas con relaciones directas o indirectas. Destaca la formación de tres grandes grupos, uno arriba a la izquierda con variables metabólicas, y dos en la parte inferior, formados por variables genéticas fundamentalmente. En el grupo superior, se agrupan variables metabólicas que han demostrado utilidad para la discriminación de la supervivencia global como son el Glu, Lac, Ala o MI. En la parte inferior, el grupo izquierdo, más compacto, agrupa alrededor del gen ISYNA1, sobreexpresado en los tumores IDH-mutados, con otros genes como el SLC6A17 y SLC6A1, cuya mayor expresión se relaciona con una mayor

supervivencia global en los glioblastomas selectivamente. El grupo inferior derecho aglomera genes que han demostrado su relación con la supervivencia global en lo gliomas, como GLS, HIK1, GLUD1 o GLUL, además de otros dos genes sobreexpresados en los tumores IDH wild-type BCAT1 y GAD1GAD67. Estos gráficos sugieren que los perfiles de expresión génica y metabolitos medidos por HRMAS se agrupan para definir patrones de comportamiento tumoral.

Con el objetivo de profundizar en el análisis estadístico interactómico, y posteriormente relacionarlo con la SG de los pacientes, buscamos la correlación entre la expresión de los genes que mejor predicen la Supervivencia Global a través de los metabolitos, encontrando las correlaciones que se exponen en la tabla 18.

Brevemente, los genes que tienen una correlación más alta con SG son CDIPT, GLPD1, GLUD1, HIK1, IGF1, PC, PLA2G2A (única inversa), SLC6A17 y SMPD1. Muchos de los genes se relacionan tanto en forma directa como inversa con metabolitos que a su vez tienen una influencia en SG. GAD1GAD67 se relaciona de forma inversa y muy significativa ($<0,01$) con Ala, Lac y Glu. El resto de metabolitos, con correlaciones menores también muestran una asociación coherente con este gen. El patrón es muy similar para GLS y GLUD1.

El gen IGF1R muestra una alta relación positiva con MI pero esto no se traduce en una relación directa con SG.

Tabla 18. Correlación del perfil genético y metabólico con la Supervivencia Global.

	MI	NAA	Ala	Lac	Cho	Glu	Gly	GPC/PC	SG
BCA1	-0,003	-0,169	0,197	0,023	0,051	0,217	0,193	0,078	-0,027
CDIPT	-0,010	-0,076	-0,031	-0,163	0,085	-0,006	0,044	0,032	0,332
CHKA	0,308	-0,005	-0,296	-0,266	0,056	-0,250	-0,155	-0,181	0,192
CS	0,350	0,262	-0,169	-0,236	0,172	-0,120	-0,458*	-0,185	-0,004
ETNK1	0,161	0,133	-0,206	-0,217	0,368*	-0,223	-0,056	-0,063	0,284
GAD1GAD25	0,098	0,079	-0,260	-0,252	-0,153	-0,277	-0,340	-0,025	0,285
GAD1GAD67	0,242	0,187	-0,589**	-0,601**	-0,321	-0,528**	-0,305	-0,311	0,225
GCK	-0,015	0,182	0,102	-0,010	-0,028	0,093	-0,344	0,066	-0,155
GH	-0,028	0,031	-0,245	-0,265	-0,123	-0,259	0,002	-0,075	0,127
GLPD1	-0,214	0,053	-0,104	-0,189	0,191	-0,034	-0,057	-0,084	0,314
GLS	0,287	0,157	-0,417*	-0,377*	-0,095	-0,312	-0,240	-0,317	0,127
GLUD1	0,295	0,087	-0,442*	-0,443*	0,020	-0,414*	-0,142	-0,261	0,317
GLUL	0,314	-0,065	-0,316	-0,315	0,156	-0,294	-0,030	-0,320	0,250
GLUT2	0,218	-0,181	-0,052	-0,122	0,260	-0,129	-0,137	-0,033	0,283
GPT	-0,196	0,152	0,222	0,253	-0,022	0,226	-0,096	0,159	0,008
HIF1A	0,435*	0,141	-0,099	-0,160	-0,013	-0,106	-0,489**	-0,067	-0,166
HIF2A	-0,031	-0,082	0,047	-0,111	0,239	0,148	0,071	0,001	0,312
HIF3A	0,019	-0,112	-0,129	-0,200	0,276	-0,143	0,092	-0,091	0,233
HIK1	0,300	-0,038	0,048	0,158	0,334	0,095	-0,148	0,012	0,305
HK2	0,158	-0,078	0,157	0,172	0,406*	0,180	-0,018	-0,082	0,240
HK3	-0,002	-0,108	0,393*	0,257	0,389*	0,336	0,087	0,056	0,069
IGF1	0,199	0,022	-0,133	-0,233	0,225	-0,220	-0,110	-0,105	0,396*
IGF1R	0,616**	0,158	-0,230	-0,184	0,082	-0,231	-0,492**	-0,129	0,014
IGFBP1	0,011	0,177	-0,110	-0,158	0,239	-0,022	0,034	-0,132	0,150
INSR	0,229	-0,080	-0,128	-0,207	0,348	-0,147	-0,063	-0,069	0,251
ISYNA1	-0,199	0,008	0,341	0,150	0,339	0,334	0,088	0,085	0,216
LDHA	0,062	0,117	-0,050	-0,114	0,332	-0,040	-0,061	-0,067	0,024
LDHB	0,336	0,124	-0,260	-0,172	0,241	-0,249	-0,173	-0,187	0,063
PC	0,265	0,086	-0,334	-0,379*	0,168	-0,289	-0,178	-0,190	0,330
PCYT1A	0,244	0,029	-0,269	-0,309	0,050	-0,256	-0,107	-0,263	0,231
PDE1A	0,268	0,294	-0,428*	-0,318	-0,193	-0,430*	-0,355	-0,373*	0,104
PDHA1	0,255	-0,058	-0,159	-0,173	0,260	-0,153	0,074	-0,185	0,218
PDHA2	-0,195	0,123	0,065	0,051	-0,129	0,119	0,044	0,045	-0,028
PDK1	0,223	-0,166	-0,143	-0,172	0,274	-0,220	0,118	-0,217	0,007
PFKM	0,333	0,218	-0,277	-0,327	0,157	-0,209	-0,437*	-0,217	0,062
PKM	0,224	0,150	0,091	0,122	0,287	0,150	-0,136	-0,054	0,032
PLA2G2A	-0,229	-0,034	0,179	0,153	0,007	0,143	-0,018	0,226	-0,307
PLCG1	0,231	-0,014	-0,260	-0,311	0,189	-0,224	0,023	-0,201	0,045
SHMT1	0,279	-0,065	-0,124	-0,125	0,249	-0,176	-0,147	-0,075	0,108
SIRT1	0,258	0,103	-0,109	-0,005	0,468*	-0,084	-0,218	-0,036	0,316
SLC6A1	-0,100	-0,087	0,295	0,259	0,208	0,268	0,064	0,187	0,246
SLC6A17	0,137	0,075	0,015	0,105	0,287	0,014	-0,271	0,009	0,406*
SMPD1	0,085	-0,036	0,084	0,091	0,317	0,080	-0,039	-0,062	0,303
TP53	0,253	-0,094	-0,034	-0,068	0,237	-0,062	-0,101	0,054	0,082
R2 Ajustado	0,460	<i>ns</i>	0,532	0,649	0,567	0,732	0,566	0,107	0,142

* Correlación significativa bilateral <0,05

** Correlación significativa bilateral <0,01

Sombreado: relevante para supervivencia.

Negrita y cursiva: genes seleccionados en Regresión Múltiple para cada metabolito

Finalmente, en la Figura 31 se muestra como en el último análisis de nuestra exploración estudiamos la relación entre la mutación IDH1 y el grado histopatológico, con el interactoma utilizando un **análisis de clústers** jerarquizado mediante análisis discriminante lineal por mínimos cuadrados bidimensional. El análisis de clústers es un método de aprendizaje no supervisado en el que el sistema agrupa los pacientes en función del análisis de gran cantidad de datos según su comportamiento estadístico similar.

El gráfico de análisis de clústers presenta, en su porción superior e izquierda sendos dendrogramas, resultado del análisis de clústers no supervisado, que agrupan variables similares en el eje de abscisas (columnas) y casos similares en el eje de las ordenadas (filas). Típicamente, reordenan las columnas y filas de las variables, de acuerdo a grupos de valores dentro de las restricciones del dendrograma, encontrándose más próximas entre sí las observaciones con mayor similitud. Visualizar la matriz de valores de esta forma, sirve de ayuda para encontrar variables que parecen ser características del mismo grupo, y también permite visualizar grupos de muestras con determinadas características comunes. La intensidad de las variables se expresan en una escala de color.

En este gráfico es destacable que no se evidencian agrupaciones significativas más allá de lo esperable entre tumores que han sido intervenidos por primera vez o recidivas, de manera que podemos concluir que el hecho de que sea recidiva o no, no influye en su patrón genético/metabólico y su comportamiento. Los tumores IDH mutados suelen ser con mayor frecuencia tumores de bajo grado o tumores anaplásicos o bien tumores de grado IV que han progresado a partir de éstos, lo cual explica la agrupación de las dos recidivas dentro del grupo de tumores IDH mutados en la parte inferior del gráfico, una de grado II y otra de grado IV, progresión a partir de un tumor de menor grado de malignidad.

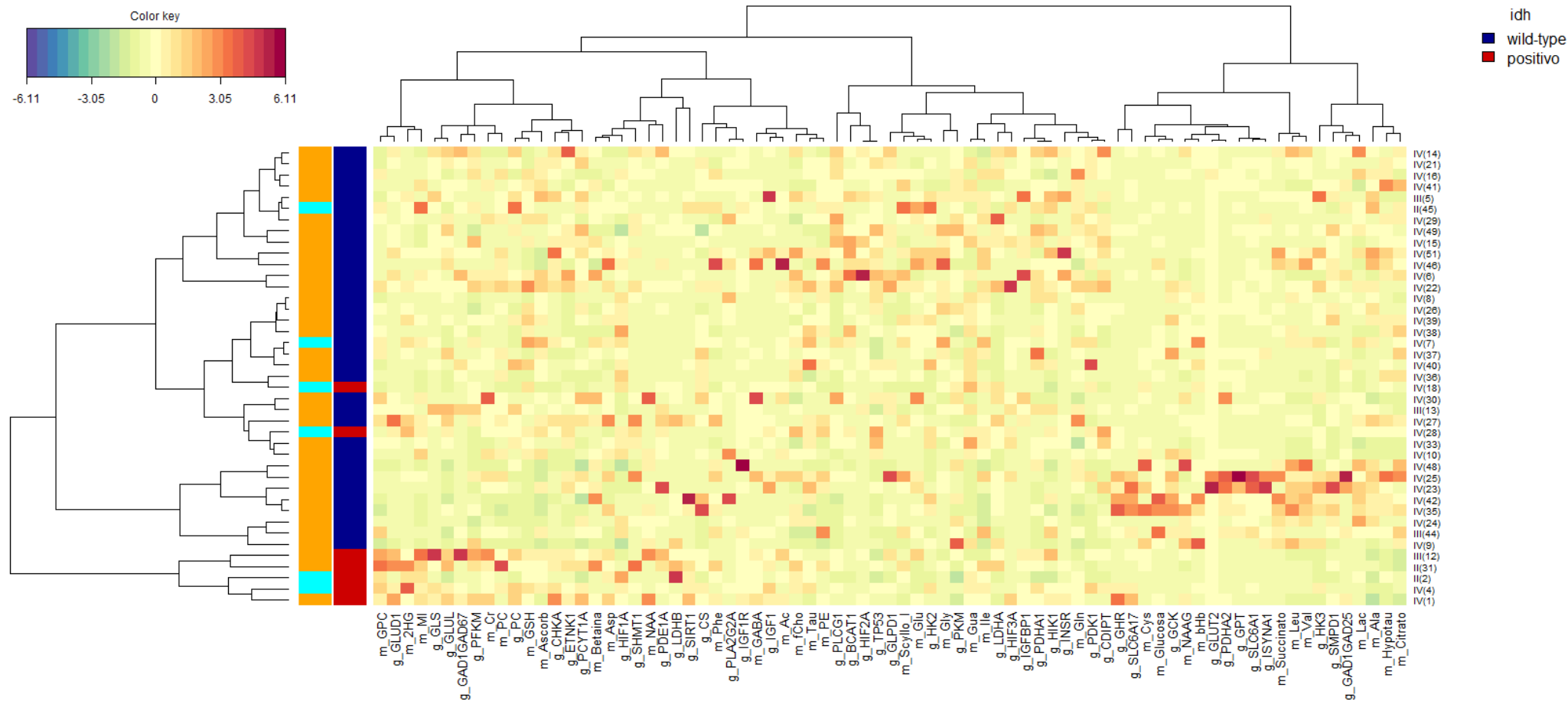


Figura 31. Análisis de clústers entre metabolitos, genes, características histopatológicas y biomoleculares de las muestras. En el eje de las abscisas se representan metabolitos y genes, en el eje de ordenadas las muestras individuales incluidas en el análisis multivariante indicando el grado tumoral (II-IV) y el número de muestra. El mapa de colores verde a rojo del interior de la tabla es proporcional a la concentración de los metabolitos obtenida mediante HRMAS o bien al perfil de expresión génica del gen correspondiente. Los códigos de colores a la izquierda identifican el estado de la mutación IDH (rojo: IDH mutado – _azul oscuro: IDH wild-type) y si se trata de una recidiva (azul cian) o de un tumor diagnosticado por primera vez (naranja).

Lo más llamativo es la agrupación no supervisada de la mayoría de los tumores IDH mutados, gracias a las variables que han sido más representativas en el resto de los análisis, agrupadas en la parte inferior izquierda del eje de abscisas (GPC, GLUD1, 2HG, MI, GLS, GLUL, etc.). Los dos casos que no se agruparon bien fueron uno por un probable error de tipificación de la mutación (tenía un estudio anatomopatológico previo con resultado wild-type) y el otro porque el comportamiento del tumor probablemente se haya parecido a un wildtype y el análisis lo ha detectado (se trataba de una recidiva de un difuso, al final de su vida al convertirse en GBM), con una supervivencia menor de lo esperado..

Todas estas correlaciones nos han permitido analizar de forma general nuestra muestra, validar nuestros resultados metabólicos y nos podrían en un futuro ayudar a entender los mecanismos relacionados con la transformación maligna y buscar posibles dianas terapéuticas.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo ha estudiado, de una manera integral, la influencia del metaboloma y de los perfiles de expresión de genes relevantes en el metabolismo tumoral, en la Supervivencia Global de pacientes portadores de gliomas de diverso grado. Brevemente, se ha construido la base de datos más completa, hasta donde conocemos, de biopsias de gliomas cerebrales que incluye muestras obtenidas, clasificadas y estudiadas, en un intervalo de tiempo de 28 años. Este largo intervalo de tiempo, justifica que se hayan producido durante el estudio, cambios en las metodologías de adquisición y procesamiento de las biopsias, para incorporar los continuos progresos del campo. Con este objeto se han realizado dos estudios; uno retrospectivo, conteniendo las biopsias obtenidas en el periodo 1992-1998, que incluye principalmente el perfil metabólico de las biopsias, y otro prospectivo, conteniendo las biopsias obtenidas en el periodo 2015-2020, que proporciona un abordaje integral considerando su perfil metabólico, su perfil genético y sus interacciones.

En general, los resultados del estudio metabolómico son similares en ambos casos, mostrando un papel dominante del MI como mejor predictor de SG, seguido de Glu/Gln, GPC, Ala y Gly para discriminar, más detalladamente, entre supervivencias cortas (CSG), intermedias (ISG) y largas (LSG). El estudio genético prospectivo confirma estos resultados encontrando, entre otras, alteraciones en los genes relacionados con estos metabolitos, incluyendo principalmente los genes del metabolismo del MI (ISYNA1, Inositol-3-fosfato sintasa 1), Gln (GLUL, GLS, GLUD1), producción de GPC (SMPD1 y GLPD1), síntesis de Gly (SHMT1) y producción de PC (PLAG2A). Además, ha sido posible evaluar las interacciones entre los perfiles metabólicos y genéticos y estudiar las agrupaciones de estas variables según sus índices de correlación. Estos análisis han demostrado un perfil genético y metabólico diferente en los tumores IDH mutados con respecto a los wild-type y ha identificado numerosos posibles biomarcadores que resultarán útiles como posibles nuevas dianas terapéuticas o marcadores pronósticos.

5.1. Supervivencia global y perfil metabólico: Estudio retrospectivo

El presente estudio complementa y amplía los factores predictores de SG descritos anteriormente basados en la clasificación de la OMS^{7,8,74} o en estudios MRI/MRS *in vivo*^{75,76,77,78,79,80,81,82,62,83,84}, proporcionando una colección integral de biomarcadores metabólicos organizados jerárquicamente mediante un CRT.

Los estudios previos de MRS/MRI *in vivo* (Tabla 19) han investigado principalmente pacientes con glioblastoma, asociando una SG corta con incrementos en PC y tCho/NAA^{62,77,81,82,83,84,85}, y una SG más larga a mayor contenido en GPC⁸⁰, proponiendo la relación Cho/Cr como biomarcador de proliferación celular y pronóstico⁸⁶.

Tabla 19. Estudios previos que correlacionan SG y biomarcadores obtenidos mediante MRI/MRS

Autores y año	Pacientes	Grado del glioma	Periodo seguimiento ^{a,b}
Li et al., 2004 ⁸³	72	GAG ^c	17,2m ^a
Reijneveld et al., 2005 ⁸⁴	14	GBG ^d	30 m (9-40) ^b
Hattingen et al., 2008 ⁷⁵	45	GBG	37m (52,1-260,5)
Chang et al., 2009 ⁶²	143	GBG & GAG	n.e.
Yamasaki et al., 2011 ⁷⁸		GAG	26,1m (6,5-83,8)
Steffen-Smith et al., 2011 ⁸²	39	GAG	7,1m (1,6-61,6)
Quon et al., 2011 ⁸¹	26	GAG	22,9m (5-37)
Hattingen et al., 2013 ⁸⁰	32	GAG (recidivas)	8,1m
Tolia et al., 2015 ⁷⁶	12	GAG	n.e.
Steidl et al., 2016 ⁷⁹	37	GAG (recidivas)	n.e.
Roldán et al., 2016 ⁷⁷	28	GAG	3-98m
Serie actual	46	GBG & GAG	14,9m (0,24-170,4)

^a Mediana de la duración del estudio en meses, ^b Entre paréntesis se incluye el rango del estudio en meses (m), ^cGAG: glioma de alto grado, ^dGBG: glioma de bajo grado, n.e.: no especificado.

Más recientemente, se ha descrito una correlación entre el 2-HG y la mutación IDH1⁸⁷, sugiriendo que la detección *in vivo* de 2-HG podría constituir un biomarcador pronóstico adicional. Sin embargo, la detección rutinaria y regular *in vivo* de 2D-HG, continua siendo un importante reto tecnológico en la mayoría de los centros de diagnóstico por imagen, lo que ha limitado aplicaciones posteriores más amplias de este metabolito.

El presente estudio aporta una cohorte mayor de pacientes examinados mediante MRS *in vitro*, una técnica disponible de manera rutinaria, y seguidos

durante un período de evolución más largo que los previamente descritos en la literatura, incluyendo además una colección de gliomas de bajo grado y gliomas de alto grado. En particular, algunos de los biomarcadores metabólicos *ex vivo* encontrados aquí, están asociados de forma estadísticamente significativa, a la predicción SG, como MI o GPC (Tabla 2), y resultan difíciles de detectar, o no resultan detectables, *in vivo*. En consecuencia, los resultados de esta Tesis sugieren que el análisis postquirúrgico mediante HR-¹H RMN de las biopsias tumorales constituyen un complemento útil a los análisis mediante MRS *in vivo*, ya disponibles previamente para predecir la SG.

En este estudio retrospectivo, implementamos además una metodología CRT para encontrar, jerárquicamente, la mejor clasificación de metabolitos para estimar la SG. Estos resultados complementan el árbol de decisión anterior propuesto por Li et al.⁸³, que consideraban la edad, las características de la RMN (T₂, T₁, volumen de captación de contraste) y biomarcadores espectroscópicos *in vivo* (Lip+Lac, Cho/Cr, y Cr/NAA), como los principales determinantes para predecir la SG en pacientes con glioblastoma.

El CRT metabólico propuesto aquí, está conformado por tres ramas. En la primera división el MI se convirtió en el biomarcador de supervivencia más robusto, con un mayor contenido de MI asociado a las supervivencias más largas. El aumento de los niveles de MI en enfermedades inflamatorias como el Alzheimer⁶¹, insuficiencia renal⁸⁸, diabetes mellitus⁸⁸ y trauma cerebral^{89,90}, sugiere además, un papel universal de este osmolito en la regulación fisiopatológica del volumen inflamatorio.

Anteriormente se han propuesto, tanto niveles aumentados^{91,92,93}, como disminuidos de MI⁸⁸, en relación al aumento de grado de gliomas *in vivo*. Nuestros resultados revelan ahora, que un aumento de los niveles de MI se asocia, definitivamente, a una SG más larga y a grados tumorales más bajos (Tabla 3). Dado que el MI se encuentra principalmente en astrocitos normales⁸⁸, proponemos que los niveles de MI detectados en las biopsias tumorales, revelan el contenido relativo de astrocitos sanos dentro de la masa tumoral. Por lo tanto, contenidos de MI mayores, revelarían la presencia de poblaciones relativamente más grandes de astrocitos normales, y más pequeñas de células tumorales, y estarían, consecuentemente, asociados a SG más largas^{61,94,95}.

La segunda rama del CRT, tras el MI, que clasifica los grupos de SG es el contenido de GPC, cuyos niveles más altos predicen SG más largas. Nuestro grupo, y otros, han descrito anteriormente que contenidos relativamente altos de GPC y PC se asocian a gliomas de bajo y alto grado, respectivamente^{56,96}. Los niveles de GPC y PC constituyen un reflejo del equilibrio entre la degradación y la síntesis de fosfolípidos, respectivamente, donde el aumento neto en los niveles de GPC revela un balance negativo entre síntesis y degradación de fosfolípidos, menor proliferación tumoral, y SGs más prolongadas.

Gly y Ala constituyen la tercera rama del CRT metabólico para diferenciar pacientes con niveles bajos, o altos de GPC, respectivamente. En nuestro estudio, los altos niveles de Gly y Ala revelan un mal pronóstico, asociado a una SG más corta. De hecho, los niveles de Ala y Gly se han descrito previamente como biomarcadores de hipoxia y de estrés redox⁹⁷, asociados a la progresión tumoral, hipoxia, estrés redox y fallo energético. Nuestros resultados permiten, ahora, asociarlos también al pronóstico de SG más cortas.

5.2. Supervivencia global e interactómica: Estudio prospectivo

El estudio prospectivo incluye una amplia serie de pacientes intervenidos de glioma cerebral, en su mayoría grado IV (79%) por lo que el tiempo de seguimiento es más reducido que en la serie retrospectiva. De hecho, en la serie prospectiva nos hemos centrado, como otros autores, en gliomas más agresivos^{83,78,82,81,76,77}, y se ha utilizado ¹H HRMAS en vez de AR 1H RMN, se han podido determinar biomarcadores genéticos, y no se han utilizado valores absolutos de concentración de metabolitos, sino valores relativos normalizados a creatina⁹⁸. En definitiva, las importantes diferencias metodológicas entre ambas series justifican que hayan sido estudiadas independientemente.

De entre los factores clínicos e histopatológicos de la serie prospectiva, el grado histológico bajo y los marcadores biomoleculares IDH1 y ATRX mutadas resultaron estadísticamente significativos, aumentando la SG (Figura 17)^{99,100}, aunque habría que mencionar que otros autores han encontrado que dichas mutaciones, por sí mismas, no se asocian a mayor SG en glioblastomas¹⁰¹.

La Figura 32 resume las alteraciones más relevantes detectadas en el metaboloma, y el genoma de las biopsias de glioma procesadas en el presente estudio, así como de sus interacciones.

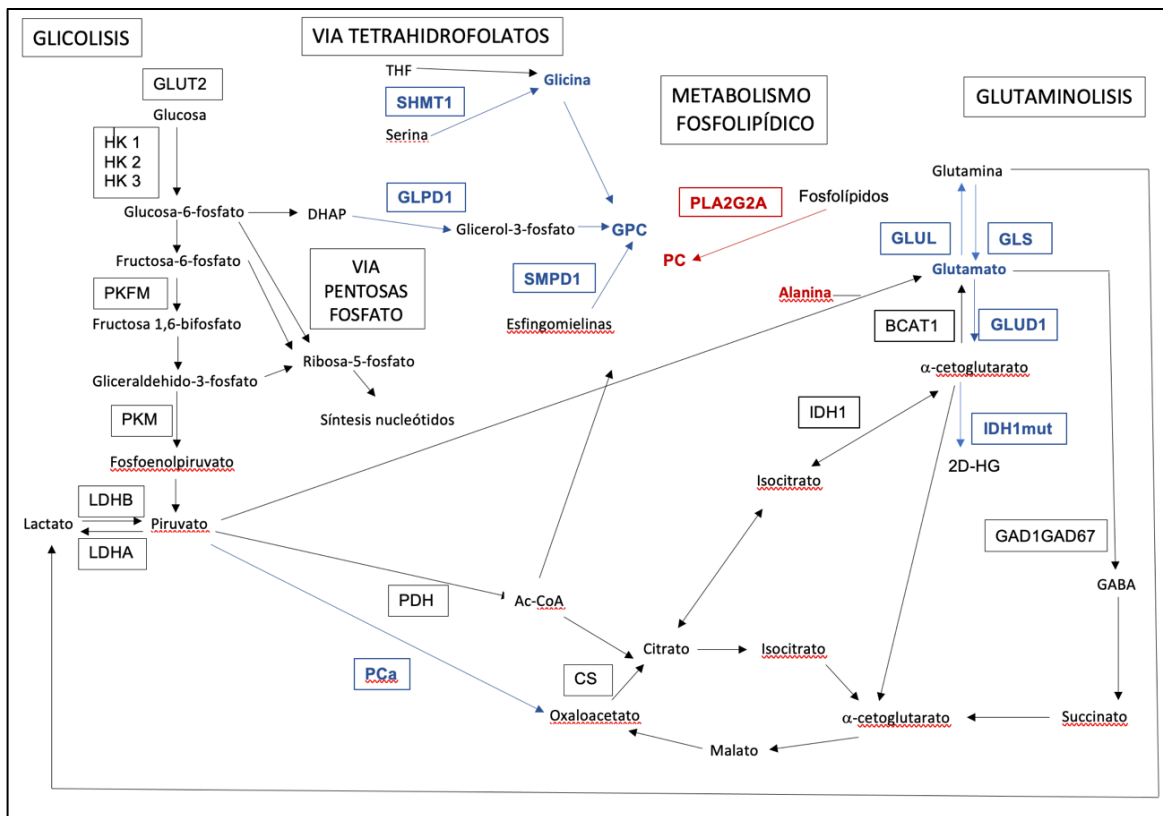


Figura 32. Alteraciones metabólicas y genéticas más relevantes detectadas en las vías principales del metabolismo celular y su relación con la SG en gliomas. Azul: relación positiva con la SG. Rojo: relación negativa con la SG.

Una descripción individualizada de las alteraciones en metabolitos y genes ayudara a comprender mejor las transformaciones observadas.

Perfil metabólico y Supervivencia Global

Myo-inositol

En el CRT metabólico que incluye gliomas grado II-IV, MI es el biomarcador que mejor se asocia, con significación estadística, a LSG (Tabla 11, Figuras 20 y 21). MI es un osmolito abundante en las células gliales y las muestras con mayor contenido de este metabolito cuentan, según nuestra hipótesis, con un porcentaje más alto de astrocitos normales, y por tanto con menor invasión tumoral del tejido glial⁸⁸. El MI presenta también, varias funciones adicionales, participando en el metabolismo lipídico y en el de glucosa¹⁰², además de efectos neurotrópicos y de supresión tumoral¹⁰³.

El abordaje interactómico revela que la sobreexpresión de CDIPT, el gen que codifica el paso de inositol a fosfatidil-inositol, el precursor de lípidos necesarios para la replicación celular, demostró también ser predictiva para las SG más largas.

Alanina

Cuando la concentración de MI es alta, la concentración baja de Ala resulta útil, no sólo para precisar la predicción de LSG, sino para también para indicar que en ese grupo, se sitúa la casi la totalidad de los grados II (10 de 11 casos, ver Tabla 13). A pesar de que la mayor parte de gliomas grado II se encuentran dentro del grupo LSG con MI alto y Ala baja, también es posible encontrar este grupo gliomas de grado III y IV, por lo que se puede concluir que la combinación MI y Ala permite emitir un pronóstico de LSG, independientemente del grado. De hecho, en la serie retrospectiva se relacionó también significativamente, y en el mismo sentido, la concentración de Ala con la SG (Figura 15).

Una circunstancia que puede ayudar a comprender mejor este comportamiento, es que la Ala está siendo utilizada para producir Glu a partir del piruvato mediante la alanina aminotransferasa (Figura 32). Notablemente, el Glu constituye, como indicaremos posteriormente, la fuente de energía principal en el Ciclo de Krebs de los tumores menos agresivos. Así, cuando Ala no se consume y permanece elevada, y la vía preferencial de producción de energía es la glucólisis, la SG es corta. En este sentido, conviene mencionar aquí, que dentro los tumores de comportamiento más maligno (MI bajo), la concentración mas elevada de Ala alto, ayuda también a diferenciar los que tendrán aún menor SG (Figura 20, nodo 8). En este contexto, la Ala constituye un buen discriminante de la actividad tumoral, no sólo para predecir LSG en los casos de Ala reducida, sino también para estimar CSG, en los casos con Ala incrementada.

Glutamato

De entre los pacientes con MI bajo, y por tanto más agresivos y de mayor grado histológico, Glu representó un biomarcador muy significativo, permitiéndonos discriminar entre CSG e ISG, incluso antes que Ala. Glu es un neurotransmisor cuya síntesis y degradación forma parte del ciclo transcelular Glu/Gln que subyace a la neurotransmisión glutamatérgica. Tras ser liberado a la cavidad sináptica por las neuronas, donde es sintetizado a partir de Gln, es captado por los astrocitos, donde se produce forma Gln, que es liberada de nuevo al medio extracelular para ser captada por las neuronas¹⁰⁴.

En nuestro CRT (Figura 20) niveles altos de Glu discriminan los pacientes con mayor SG dentro del grupo CSG, prediciendo así ISG. De hecho, un estudio reciente indica que los niveles altos de Glu están relacionados con la presencia de la mutación IDH¹⁰⁵, y un mejor pronóstico. Sin embargo, nuestro estudio indica que el mejor pronóstico en los pacientes con concentraciones de Glu alto, es completamente independiente de esta mutación. De hecho, en nuestra muestra, los pacientes con IDH1 mutado se encuentran entre los de menor concentración de Glu (nodo 3, Figuras 20 y 21).

En la literatura, se ha descrito previamente un descenso de Gln y del cociente de Glu/Gln en los glioblastomas, con respecto a los astrocitomas de bajo grado¹⁰⁶. También nuestro estudio retrospectivo, mostró que Glu clasificaba directamente los pacientes en CSG o ISG, dado que Glu es prácticamente inexistente en los pacientes con LSG (Figura 15). Por otro lado, diversos autores han comunicado concentraciones aumentadas de Glu en los astrocitomas de alto grado, con respecto a aquellos de bajo grado^{107,108}. En nuestro estudio prospectivo, la totalidad de los gliomas grado II se sitúan en el grupo de MI alto (tabla 13), por lo que el Glu constituye, en realidad, un buen biomarcador discriminante dentro de los gliomas de alto grado, ya que se sitúa como determinante dentro de los de MI bajo (figura 20, donde en el grupo MI bajo sólo hay gliomas III y IV). Además, el Glu podría tener efectos autocrinos o paracrinos sobre el crecimiento, supervivencia y proliferación celular^{109,110}.

Nuestra hipótesis es que los altos niveles de Glu corresponden a una activación de la vía de la glutaminólisis como generador de sustrato para el ciclo de Krebs en los gliomas de alto grado. Esta vía prevalece sobre la vía de la glucólisis en los pacientes que presentan ISG, independientemente de la

mutación IDH1. Como ya hemos visto previamente, en los pacientes en los que la vía preferencial es la glucólisis, Glu disminuye y Ala se eleva, lo que predice CSG (nodo 8).

Glu se produce a partir de Gln en las neuronas en una reacción catalizada por la glutaminasa, expresada por gen GLS (Figura 32). La reacción contraria permite formar Gln a partir de Glu, mediante la enzima glutamina sintasa (expresión del gen GLUL), un enzima que sólo ocurre en las células gliales. Durante la glutaminólisis, el Glu producido es transformado en α -cetoglutarato mediante la glutamato deshidrogenasa (codificada por en el gen GLUD1), constituyendo una importante contribución de carbonos y energía al ciclo de Krebs¹¹¹. Es conocido que la mutación IDH1 en los gliomas rompe este ciclo, desviando el α -cetoglutarato del Ciclo de Krebs, hacia la producción 2D-HG¹¹², disminuyendo así la posible utilización energética del Glu.

Lenting et al.¹⁰⁵ describieron la sobreexpresión de GLUD1 en los tumores con IDH1 mutada. Nuestros datos no confirman esta asociación (Tabla 15). Sin embargo, en nuestro estudio interactómico se observa que tanto GLS, GLUD1 y GLUL están, directa y significativamente asociados, con SG (Tabla 14, Figura 23). Esto corrobora nuestra propuesta de que la sobreexpresión de la glutaminólisis se da en tumores menos agresivos, bien para formar α -cetoglutarato y obtener sustrato para el ciclo de Krebs, o bien para obtener Glu y sostener la neurotransmisión glutamatérgica. Cabe destacar aquí, que cuando seleccionamos sólo glioblastomas wild-type, GLUL fue el único gen de la vía cuya sobreexpresión se correlacionó con una mayor SG (Tabla 17).

Por otro lado, Glu también forma parte del ciclo Glu-GABA. Cuando estudiamos dicho ciclo encontramos que la sobreexpresión de GAD1GAD67 se correlaciona de forma estadísticamente significativa con la disminución del Glu (Tabla 18). Esto se debe probablemente a que metabolito que está siendo utilizado para producir GABA y alimentar el ciclo tricarboxílico. Esto justificaría las concentraciones de Lac y Ala bajas asociadas a la sobreexpresión de GAD1GAD67, ya que el Glu se está produciendo, por transaminación, a partir de ellos.

Fosfolípidos, GPC/PC y esfingomielina

En los glioblastomas (Figura 22) el cociente GPC/PC bajo discrimina los 6 casos con SG más baja. Dentro de nuestro grupo de investigación, Righi et al.⁵⁷, describieron un aumento de las fosfolipasas PLA1 y PLA2, y de los genes relacionados con el transporte de Cho y las enzimas citidil-transferasas, como determinantes del aumento de GPC en los gliomas de bajo grado. Mas aún, varias investigaciones previas coinciden en un aumento de la GPC o de GPC/PC en los gliomas de bajo grado^{96,113,114}. Sin embargo, nuestra serie prospectiva no muestra asociación de estas variables con el bajo grado sino, más directamente con la SG (independientemente del grado), dado que cociente GPC/PC constituyó un biomarcador pronóstico de SG. Esta circunstancia es aún más importante cuando clasificamos tan sólo los glioblastomas (Figura 22).

En nuestro estudio interactómico encontramos además que la sobreexpresión de GLPD1, gen que codifica la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, demostró alargar la SG de forma estadísticamente significativa (Tabla 18). GLPD1 es un enzima que juega un papel clave en la glicolisis aeróbica convirtiendo dihidroxiacetona fosfato en glicerol-3-fosfato, que es el precursor de GPC^{115,116}. De este modo, tanto GLPD1 sobreexpresado, como GPC aumentado, resultan predictivos de SG más largas.

En contraste con el caso anterior, encontramos que la sobreexpresión de PLAG2A acortaba la SG de forma estadísticamente significativa (Tablas 14 y 18). PLAG2A forma parte de la familia de las fosfolipasas y juega un rol crucial en la generación de lípidos bioactivos, mecanismos de defensa y señalización celular¹¹⁷. Hasta el momento PLAG2A es la única fosfolipasa que ha demostrado asociación con el pronóstico en gliomas cerebrales¹¹⁸. Nosotros hemos encontrado también dicha correlación hipotetizando que, tal y como afirmaron Righi et al.⁵⁶, aumenta la concentración de PC y por tanto disminuye el cociente GPC/PC, algo que según nuestros estudios retrospectivo y prospectivo, predice CSG. Otros autores han referido que la sobreexpresión de PLAG2A también se correlaciona con resistencia a la quimioterapia¹¹⁹.

Otro hallazgo interactómico, dentro del metabolismo lipídico, es que la sobreexpresión de SMPD1, presenta asociación con SG con una significación estadística muy alta, tanto en la muestra total, como en glioblastomas wild-type (Tablas 14, 16 y 17). Además, SMPD1 también se asocia con un aumento de

Cho (tabla 18). SMPD1 es una hidrolasa que juega un rol esencial en las reacciones metabólicas de la esfingomielina, componente clave de la membrana plasmática que interacciona con colesterol y glicerofosfolípidos, manteniendo la estabilidad en la estructura de las membranas lipídicas. Un estudio previo ha correlacionado el metabolismo de la esfingomielina con la tumorigénesis del glioma¹²⁰, describiendo una disminución de esfingomielina en células tumorales, en comparación con las normales. Algunos autores también han destacado el papel de las ceramidas en la apoptosis de las células tumorales y asociando su acumulación a una mayor sensibilidad a la radioterapia y quimioterapia¹²¹.

Glicina

Finalmente, el último metabolito útil para predecir la SG en nuestro CRT de glioblastomas es Gly. Gly es un neurotransmisor que aporta nitrógeno para las bases purícas y que se sintetiza a partir de serina, por la serina hydroxymethyl-transferase 1, codificada por el gen SHMT1¹²². SHMT1 ha mostrado una actividad aumentada en cultivos celulares de gliomas¹²³, sugiriendo que produce una derivación de metabolitos de la vía de las pentosas fosfato hacia la síntesis de nucleótidos. A pesar de que se ha descrito previamente el potencial predictor de malignidad de SHMT1 por encontrarse más elevada en tumores neuroepiteliales malignos en niños y adultos^{114,113,124,53,125} y en astrocitomas de alto grado⁵², nuestros resultados muestran que tanto la elevada concentración de Gly, como la sobreexpresión de SHMT1, predicen una SG más larga en glioblastomas wild-type (Figura 22, Tabla 16) con una relación GPC/PC favorable para SG.

Perfil genético y Supervivencia Global

Piruvato Carboxilasa (PCa)

La expresión de PCa, que codifica el enzima responsable de la producción de oxaloacetato a partir de piruvato, se correlacionó de forma positiva con la SG. Lenting et al.¹²⁶ describieron niveles más altos de este enzima anaplerótico en el Ciclo Tricarboxílico de los gliomas IDH1 mutados.

La IDH1 mutada transforma α -cetoglutarato en 2-HG, disminuyendo así el α -cetoglutarato disponible para alimentar el ciclo tricarboxílico. La sobreexpresión

de PCa puede compensar este defecto, generando anapleróticamente oxalacetato adicional (a partir de piruvato), aliviando así el estrés metabólico que produce este fenómeno. Brevemente, la transformación de α -cetoglutarato en 2-HG disminuye el potencial redox NADP/NADPH, creando las condiciones necesarias para que Lac se oxide a piruvato. El piruvato así producido se transformaría en oxaloacetato por PCa sobreexpresada, aportando carbonos suplementarios oxidables en ciclo tricarboxílico. Nuestros resultados confirman esta teoría ya que la sobreexpresión de PCa se asocia de forma estadísticamente significativa a la disminución de la concentración de Lac.

SLC6A1 Y SLC6A17

La familia de genes SLC6 juega un rol importante en diferentes procesos fisiológicos como el transporte de metabolitos como glucosa, lactato y neurotransmisores, la neurotransmisión, y conducta motora^{127,128}. En nuestro estudio prospectivo, la expresión de SLC6A1 y SLC6A17 resultaron estadísticamente significativas en el grupo de glioblastomas (Tabla 16). Sin embargo, no se encontró significación estadística en su relación con metabolitos.

SLC6A1 codifica el transportador de GABA dependiente de cloro y sodio, y restaura las concentraciones basales de GABA en terminales presinápticos tras la neurotransmisión GABAérgica, eliminando el exceso de GABA¹²⁹. Se ha demostrado su relación con diferentes enfermedades del SNC como epilepsia¹³⁰, esquizofrenia¹³¹, esclerosis hipocámpal¹³² y con la resistencia al tratamiento en cáncer de próstata¹³³. Su expresión aberrante se ha encontrado en la metaplasia gástrica¹³⁴ y en el carcinoma de células renales¹³⁵. En nuestra serie mostró potencial predictor para SG más larga en glioblastomas.

SLC6A17 es un transportador de monoaminas como la dopamina, cuyo papel en el control de la proliferación y migración celular ha sido previamente descrito. Se piensa que su sobreexpresión causa un aumento de prolina que inhibe la recaptación de GABA, y termina por bloquear la proliferación y migración celular¹³⁶.

SIRT1

En nuestro abordaje interactómico SIRT1 (sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD) demostró ser predictor de SG aumentada y directamente

relacionado con el aumento de Cho. Se trata de una desacetilasa de histonas cuya relación con la tumorigénesis y la progresión tumoral ha sido estudiada sin resultados concluyentes en el caso de los gliomas¹³⁷.

Por un lado, Qu et al.¹³⁸ describieron que el bloqueo de SIRT1 inhibe el crecimiento y proliferación y promueve la apoptosis en gliomas. Otros autores describen su papel activando oncoproteínas y favoreciendo un microambiente favorable a la proliferación tumoral¹³⁹ y que su inhibición aumenta la radiosensibilidad^{140,141,138}. Liu et al.¹⁴¹ describieron la sobreexpresión de SIRT1 en células madre de glioblastoma pobremente diferenciadas CD-133 positivas.

Paradójicamente, también ha sido descrita su actividad como supresor tumoral^{142,139} e inhibidor de la inflamación. Wang et al.¹⁴³ describen una baja expresión de SIRT1 en glioblastomas en comparación con células normales. Romeo et al.¹³⁷ que demuestran que la expresión de SIRT1 en los gliomas es inversamente proporcional a su grado histológico y siempre menor que en el tejido normal. Sin embargo, no existe publicado en la literatura su papel en relación con la SG.

Diversos fármacos^{144,145} que tienen como objetivo estimular la expresión de SIRT1 para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 han mostrado disminuir el crecimiento tumoral en cultivos celulares 2D y 3D. Su principal mecanismo de acción parece, en realidad, inducir la inhibición del crecimiento tumoral dependiente del estrés del retículo endoplásmico.

IGF1

Los factores de crecimiento insulínicos (IGFs) participan en el metabolismo de lípidos, proteínas y glucosa¹⁴⁶ y en la regulación del balance de energía y crecimiento celular. Algunos estudios recientes también los relacionan con la biología del cáncer^{147,148}. En ese sentido, diversas terapias que incluyen anticuerpos anti-receptores de IGF1 (IGFRs) están siendo recientemente investigadas. En nuestra serie, la sobreexpresión de IGF1 demostró predecir mayor SG. En ese sentido, Wang et al. describieron también la capacidad predictiva de mayor SG de tenía la sobreexpresión del receptor de IGF1 en pacientes tratados con temozolomida¹⁴⁹. Dado que nuestra serie incluye pacientes tratados con temozolomida que han presentado una recidiva no podemos descartar que nuestros resultados reflejen, al menos en parte, esta

afirmación. Futuras investigaciones con mayor número de pacientes podrían ayudar, sin duda, a discernir entre estas posibilidades.

Nuestro estudio interactómico (Tabla 18) muestra además la sobreexpresión de IGFR1, una correlación significativa con el aumento de MI y con disminución de Gly. Ambos resultados interactómicos reflejan un patrón de predicción de SG más larga.

HIF2A

Los HIF (Hypoxia Inducible Factors) tienen un papel importante en la tumorigénesis, favoreciendo la detección del microambiente hipóxico adecuado para favorecer la progresión tumoral. Brevemente, desarrollan un papel facilitador de la neo-angiogénesis y han sido ampliamente descritos como reguladores de la homeostasis redox mitocondrial, aumentando la capacidad antioxidante en condiciones de hipoxia¹⁵⁰. HIF-2^a, en particular, se ha relacionado con pobre SG en los pacientes con glioblastomas¹⁵¹. Se ha propuesto que podrían ser una diana apropiada para fármacos antitumorales. Sin embargo, el inhibidor de HIF-2A ha originado resultados con elevada variabilidad en cuanto a sensibilidad *in vitro*¹⁵². En nuestro estudio prospectivo la expresión de HIF2A se asocia a mayor SG.

HK1

Las hexoquinas I-IV catalizan la fosforilación de la glucosa en la glucólisis¹⁵³. Las células tumorales, muy glucolíticas aumentan la expresión de HK y los enzimas glicolíticos cruciales (incluyendo PFK y PK), algo que ha sido detectado repetidamente en diversos tipos de tumores como pulmón, gastrointestinales y mama¹⁵⁴. En gliomas sólo se ha probado un anti-HK2¹⁵⁵, mientras que el papel específico de HK1 en el glioma no está definido. En nuestra serie, se demostró estadísticamente significativo en la larga SG.

Perfil genético en gliomas IDH1 mutados y wild-type

BCAT1

A pesar de que BCAT1 (Branched Chain Amino acid Transferase) no mostró ninguna correlación con SG ni patrón metabólico en nuestro estudio, sí

encontramos diferencias estadísticamente significativas en su perfil de expresión entre gliomas IDH1 mutados y wild-type. Notablemente, se ha descrito ampliamente que la expresión de IDH1 mutada y del gen BCAT1 son mutuamente excluyentes. BCAT1 transfiere un grupo amino desde los aminoácidos ramificados a α -cetoglutarato, generando Glu en los tumores IDH1 wild-type. Consecuentemente, su papel podría involucrar la producción de carbonos de Glu para abastecer el Ciclo Tricarboxílico.

GCK

La Glucokinasa, o hexokinasa IV, es un enzima que cataliza la conversión de glucosa a glucosa 6-fosfato y se considera un sensor de glucosa, en hígado y páncreas, entre otros tejidos. En algunos tumores inicia la glucólisis aerobia, una de las principales huellas del cáncer^{156,157}. En nuestro estudio prospectivo también se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de GCK entre gliomas IDH1 mutados y wild-type. Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de GCK en los gliomas wild-type revela su comportamiento más agresivo, y como hemos propuesto previamente, la glucólisis aeróbica y la producción de Lac dominantes en los gliomas más malignos.

ISYNA1

La inositol 3-fosfato sintasa codifica un enzima esencial en el metabolismo del *myo*-inositol. ISYNA1 ha mostrado su efecto como supresor del crecimiento tumoral, un efecto que también han mostrado las alta concentraciones de MI¹⁵⁸. En nuestro caso, encontramos mayor expresión de ISYNA1 en los gliomas portadores de la mutación IDH que, como hemos mencionado anteriormente presentan un alto contenido de MI, que predice supervivencias largas.

Limitaciones

Estudio retrospectivo

El período de tiempo de la recolección de biopsias en este estudio precedió a algunos de los avances más recientes en la caracterización genética del glioma y su influencia en la malignidad y SG. Esta circunstancia, y el largo período de supervivencia investigado, impidió el uso de biomarcadores genéticos validados con posterioridad al estudio retrospectivo presentado. De esta manera, las correlaciones entre los biomarcadores metabolómicos y genómicos en la SG del glioma merecerían una investigación más profunda, como realizamos en el posterior estudio prospectivo. Por último, el número de pacientes incluidos en el presente estudio piloto es, reconocidamente, pequeño. Sin embargo, resulta lo suficientemente robusto para apoyar la utilización de biomarcadores metabolómicos detectados por AR-¹HMRS *in vitro*, en las predicciones de la SG postoperatoria en pacientes con glioma cerebral.

Estudio prospectivo

Encontramos limitaciones para comparar el estudio retrospectivo y prospectivo de forma más precisa puesto que la normalización de datos espectroscópicos se realizó empleando métodos diferentes (porcentaje molar en el caso del estudio retrospectivo y cociente con Creatina en el prospectivo). Aún así, los resultados de ambos estudios son muy similares, indicando que, muy posiblemente, estas diferencias no afectan significativamente a las predicciones de SG.

La base de datos prospectiva, al ser más reciente, involucra menos tiempo de seguimiento y está compuesta por un mayor número de biopsias de glioma grado IV IDH1 wild-type, implicando menor SG. En este sentido, el análisis interactómico merece ser implementado con un mayor número de muestras, separándolas por grado histológico, y mutación IDH1.

Finalmente, dado que es el balance entre procesos oncogénicos y oncosupresores, y no una mutación única, lo que parece determinar el desarrollo de los gliomas, resultó mas recomendable estudiar la SG en función de la genómica, a través de su relación (interacción) con los metabolitos. Sin embargo, los genes investigados sí tenían una relación sostenida, significativa y ordenada

operando a través del patrón metabólico estudiado. No hemos encontrado en la literatura, hasta donde conocemos, nada similar descrito previamente.

6. CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo de Tesis Doctoral, podemos obtener las siguientes conclusiones:

1. La creación de una base de datos sistematizada de gliomas humanos ha demostrado ser fundamental para mejorar el conocimiento sobre el comportamiento o agresividad tumoral estimado a partir de la Supervivencia Global y ha hecho posible la integración del perfil metabólico estudiado mediante AR-ERM ¹H y del perfil de expresión de genes relacionados con el metabolismo tumoral de manera prospectiva.
2. El análisis de supervivencia mediante árboles de clasificación y regresión de la base de datos retrospectiva (66 pacientes, desde 1992 a 1998) de biopsias quirúrgicas de gliomas cerebrales humanos ha demostrado que factores clave en el metaboloma tumoral se relacionan con el comportamiento del mismo estimado a partir de su Supervivencia Global, de forma independiente del grado histológico según patrones morfológicos. Los metabolitos más relevantes fueron el MI y GPC, relacionados positivamente con la Supervivencia Global; y las concentraciones de Ala y PC, relacionados negativamente con la supervivencia global.
3. En el análisis de supervivencia realizado mediante de árboles de clasificación y regresión de las serie de datos prospectiva (100 pacientes, desde 2015 a 2019) ha corroborado la utilidad de esta técnica, sugiriendo que la agresividad tumoral, medida como Supervivencia Global, se manifiesta a través de cambios profundos en el metabolismo tumoral, útiles para establecer factores pronósticos. Los factores pronósticos más relevantes obtenidos a partir del metaboloma tumoral son de nuevo el MI, Glu, Ala, Cho total y ratio GPC/PC.
4. En 41 pacientes de la muestra prospectiva se estudió el perfil de expresión de 44 genes relevantes en el metabolismo tumoral. Nuestro trabajo sugiere que la agresividad tumoral, medida como Supervivencia Global, produce cambios profundos en el perfil de expresión de este grupo de genes, que resultan útiles como marcadores pronósticos. De forma resumida, la sobreexpresión de los genes relacionados con la

glutaminólisis (GLS, GLUD1, GLUL), vía de tetrahidrofolatos (SHMT1) y formación de glicerofosfolípidos (SMPD1 y GLPD1) mostraron correlación positiva con la Supervivencia Global, demostrando que estas son las vías de obtención de energía en tumores de alto grado con menor agresividad, concretamente los que presentaron ISG. Además, la piruvato carboxilasa (PCa) fue la elegida por dichos tumores para metabolizar el piruvato y alimentar el ciclo de Krebs, en lugar de la PDH. Destaca la no sobreexpresión de la glucólisis en tumores de menor agresividad y la sobreexpresión de PLA2G2A, que presentó correlación negativa con la Supervivencia Global. Otros factores como Factor Inducible por Hipoxia HIF2A, Hexokinasa IHK1, Factor de crecimiento de insulina IGF1, Sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD SIRT1 que presentaron correlación positiva con la Supervivencia Global podrían ser objeto de estudios posteriores.

5. Adicionalmente, los IDH mutados muestran un perfil de expresión génica y perfil metabólico diferente que permite su clara diferenciación mediante técnicas supervisadas y no supervisadas, lo que sugiere una activación de diferentes vías metabólicas en ambos tipos tumorales. En los tumores IDH mutados no se detectó Glu como biomarcador y sus niveles fueron muy bajos. Podemos concluir que el hecho de que se transforme en 2-HG reduce los niveles de dicho metabolito. Sin embargo, sí se detectó el aumento de GPC, por lo que la formación de glicerofosfolípidos sí se encuentra aumentada.
6. Las técnicas de análisis interactómico (gráficos y mapas de correlación; dendrogramas) han demostrado ser fundamentales para la identificación de relaciones entre las diferentes variables genéticas y metabólicas relacionadas previamente con la Supervivencia Global o clasificación de tumores según estado de la mutación IDH y se han identificado potenciales biomarcadores pronósticos y futuras dianas terapéuticas como los genes implicados en la glutaminólisis (GLS, GLUD1, GLUL), vía de tetrahidrofolatos (SHMT1), formación de GPC (SMPD1 y GLPD1) y Piruvato carboxilasa (PCa).

7. BIBLIOGRAFIA

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* (2018). doi:10.3322/caac.21492
2. The Global Cancer Observatory, G. Source: Globocan 2018. *World Heal. Organ.* (2019).
3. Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S. & Barnholtz-Sloan, J. S. Epidemiology of Intracranial Gliomas. *Prog. Neurol. Surg.* (2017). doi:10.1159/000464374
4. Bauchet, L. & Ostrom, Q. T. Epidemiology and Molecular Epidemiology. *Neurosurgery Clinics of North America* (2019). doi:10.1016/j.nec.2018.08.010
5. Kleihues, P., Burger, P. C. & Scheithauer, B. W. The New WHO Classification of Brain Tumours. in *Brain Pathology* (1993). doi:10.1111/j.1750-3639.1993.tb00752.x
6. Kleihues, P. *et al.* The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* (2002). doi:10.1093/jnen/61.3.215
7. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* (2007). doi:10.1007/s00401-007-0243-4
8. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* (2016). doi:10.1007/s00401-016-1545-1
9. Reynolds, B. A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* (80-.). (1992). doi:10.1126/science.1553558
10. Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. A., Ming, G. & Gage, F. H. N EUROGENESIS IN THE A DULT B RAIN : New Strategies for Central Nervous System Diseases . *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (2004). doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121631
11. Morshead, C. M. *et al.* Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: A relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* (1994). doi:10.1016/0896-6273(94)90046-9
12. Sanai, N., Alvarez-Buylla, A. & Berger, M. S. Neural Stem Cells and the

- Origin of Gliomas. *N. Engl. J. Med.* (2005). doi:10.1056/nejmra043666
13. Alcantara Llaguno, S. *et al.* Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell* (2009). doi:10.1016/j.ccr.2008.12.006
 14. Lee, J. H. *et al.* Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* (2018). doi:10.1038/s41586-018-0389-3
 15. Lu, Q. R., Qian, L. & Zhou, X. Developmental origins and oncogenic pathways in malignant brain tumors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* (2019). doi:10.1002/wdev.342
 16. Galvao, R. P. *et al.* Transformation of quiescent adult oligodendrocyte precursor cells into malignant glioma through a multistep reactivation process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2014). doi:10.1073/pnas.1414389111
 17. Alcantara Llaguno, S. R. *et al.* Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell* (2015). doi:10.1016/j.ccell.2015.09.007
 18. Lindberg, N. *et al.* Oncogenic Signaling Is Dominant to Cell of Origin and Dictates Astrocytic or Oligodendroglial Tumor Development from Oligodendrocyte Precursor Cells. *J. Neurosci.* (2014). doi:10.1523/jneurosci.2977-14.2014
 19. Watkins, S. *et al.* Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat. Commun.* (2014). doi:10.1038/ncomms5196
 20. Dvorak, H. F. Tumors: Wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol. Res.* (2015). doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0209
 21. Valdor, R. *et al.* Glioblastoma ablates pericytes antitumor immune function through aberrant up-regulation of chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2019). doi:10.1073/pnas.1903542116
 22. Schiffer, D., Annovazzi, L., Casalone, C., Corona, C. & Mellai, M. Glioblastoma: Microenvironment and niche concept. *Cancers* (2019). doi:10.3390/cancers11010005
 23. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

24. Lottaz, C. *et al.* Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res.* (2010). doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1707
25. Beier, D. *et al.* CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* (2007). doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4180
26. Agnihotri, S. & Zadeh, G. Metabolic reprogramming in glioblastoma: The influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. *Neuro. Oncol.* (2016). doi:10.1093/neuonc/nov125
27. Bunse, L. *et al.* Suppression of antitumor T cell immunity by the oncometabolite (R)-2-hydroxyglutarate. *Nat. Med.* (2018). doi:10.1038/s41591-018-0095-6
28. Zhao, S. *et al.* Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science* (80-.). (2009). doi:10.1126/science.1170944
29. Abedalthagafi, M. *et al.* The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: A multi-institutional study of 214 astrocytomas. *Mod. Pathol.* (2013). doi:10.1038/modpathol.2013.90
30. Jiao, Y. *et al.* Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* (2012). doi:10.18632/oncotarget.588
31. Hermanson, M. *et al.* Platelet-derived Growth Factor and Its Receptors in Human Glioma Tissue: Expression of Messenger RNA and Protein Suggests the Presence of Autocrine and Paracrine Loops. *Cancer Res.* (1992).
32. Brat, D. J. & Van Meir, E. G. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Laboratory Investigation* (2004). doi:10.1038/labinvest.3700070
33. Heiden, M. G. Vander, Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* (2009). doi:10.1126/science.1160809
34. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* (2000).

- doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
35. Patra, K. C. & Hay, N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences* (2014). doi:10.1016/j.tibs.2014.06.005
 36. Mullen, A. R. *et al.* Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature10642
 37. Bauer, D. E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C. & Thompson, C. B. ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* (2005). doi:10.1038/sj.onc.1208773
 38. Keiji, E. JEOL, NMR and ESR: A 65 year evolution. *J. Magn. Reson.* (2019). doi:10.1016/j.jmr.2019.07.033
 39. Nerli, S., McShan, A. C. & Sgourakis, N. G. Chemical shift-based methods in NMR structure determination. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (2018). doi:10.1016/j.pnmrs.2018.03.002
 40. Govindaraju, V., Young, K. & Maudsley, A. A. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed.* (2000). doi:10.1002/1099-1492(200005)13:3<129::AID-NBM619>3.0.CO;2-V
 41. Jameson, C. J. Understanding NMR chemical shifts. *Annu. Rev. Phys. Chem.* (1996). doi:10.1146/annurev.physchem.47.1.135
 42. Glover, G. H. Overview of functional magnetic resonance imaging. *Neurosurgery Clinics of North America* (2011). doi:10.1016/j.nec.2010.11.001
 43. Sotak, C. H. Nuclear magnetic resonance (NMR) measurement of the apparent diffusion coefficient (ADC) of tissue water and its relationship to cell volume changes in pathological states. *Neurochem. Int.* (2004). doi:10.1016/j.neuint.2003.11.010
 44. Shukla, G. *et al.* Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: A review. *Chinese Clinical Oncology* (2017). doi:10.21037/cco.2017.06.28
 45. Rhodes, C. J. Magnetic resonance spectroscopy. *Science Progress* (2017). doi:10.3184/003685017X14993478654307
 46. Alimenti, A. *et al.* Monovoxel 1H magnetic resonance spectroscopy in the progression of gliomas. *Eur. Neurol.* (2007). doi:10.1159/000107940
 47. Durmo, F. *et al.* Multivoxel 1H-MR Spectroscopy Biometrics for Preoperative Differentiation Between Brain Tumors. *Tomogr. (Ann Arbor, Mich.)* (2018). doi:10.18383/j.tom.2018.00051

48. Durmo, F. *et al.* Multibiometric multivoxel mr spectroscopy for distinction between brain tumours. *Neuroradiology* (2017).
49. Kruk, J. *et al.* NMR Techniques in Metabolomic Studies: A Quick Overview on Examples of Utilization. *Applied Magnetic Resonance* (2017). doi:10.1007/s00723-016-0846-9
50. Blaženović, I., Kind, T., Ji, J. & Fiehn, O. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. *Metabolites* (2018). doi:10.3390/metabo8020031
51. Roda, J. M. *et al.* Nonhistological diagnosis of human cerebral tumors by ¹H magnetic resonance spectroscopy and amino acid analysis. *Clin. Cancer Res.* (2000).
52. Solivera, J., Cerdán, S., Pascual, J. M., Barrios, L. & Roda, J. M. Assessment of ³¹P-NMR analysis of phospholipid profiles for potential differential diagnosis of human cerebral tumors. *NMR Biomed.* (2009). doi:10.1002/nbm.1387
53. Righi, V., Andronesi, O. C., Mintzopoulos, D., Black, P. M. & Tzika, A. A. High-resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy detects glycine as a biomarker in brain tumors. *Int. J. Oncol.* (2010). doi:10.3892/ijo-00000500
54. Pandey, R., Caflisch, L., Lodi, A., Brenner, A. J. & Tiziani, S. Metabolomic signature of brain cancer. *Mol. Carcinog.* (2017). doi:10.1002/mc.22694
55. Payne, G. S. Clinical applications of in vivo magnetic resonance spectroscopy in oncology. *Physics in Medicine and Biology* (2018). doi:10.1088/1361-6560/aae61e
56. Righi, V. *et al.* ¹H HR-MAS and genomic analysis of human tumor biopsies discriminate between high and low grade astrocytomas. *NMR Biomed.* (2009). doi:10.1002/nbm.1377
57. Righi, V. *et al.* Spatially Resolved Bioenergetic and Genetic Reprogramming Through the Brain of Rats Bearing Implanted C6 Gliomas As Detected by Multinuclear High-Resolution Magic Angle Spinning and Genomic Analysis. *J. Proteome Res.* (2018). doi:10.1021/acs.jproteome.8b00130
58. Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A. L. & Colman, H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*

- (2017). doi:10.1007/s13311-017-0519-x
59. Masui, K., Mischel, P. S. & Reifenberger, G. Molecular classification of gliomas. in *Handbook of Clinical Neurology* (2016). doi:10.1016/B978-0-12-802997-8.00006-2
 60. Gandía-González, M. L. *et al.* Assessment of overall survival in glioma patients as predicted by metabolomic criteria. *Front. Oncol.* (2019). doi:10.3389/fonc.2019.00328
 61. Hattingen, E. *et al.* Myo-inositol: A marker of reactive astrogliosis in glial tumors? *NMR Biomed.* (2008). doi:10.1002/nbm.1186
 62. Chang, S. M. *et al.* Integration of preoperative anatomic and metabolic physiologic imaging of newly diagnosed glioma. *J. Neurooncol.* (2009). doi:10.1007/s11060-009-9845-0
 63. Shinoda, J. *et al.* Selection of eligible patients with supratentorial glioblastoma multiforme for gross total resection. *J. Neurooncol.* (2001). doi:10.1023/A:1010624504311
 64. Matyja, E., Grajkowska, W., Stępień, K. & Naganska, E. Heterogeneity of histopathological presentation of pilocytic astrocytoma - Diagnostic pitfalls. A review. *Folia Neuropathologica* (2016). doi:10.5114/fn.2016.62530
 65. Collins, V. P., Jones, D. T. W. & Giannini, C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica* (2015). doi:10.1007/s00401-015-1410-7
 66. Cerdán, S., Parrilla, R., Santoro, J. & Rico, M. ¹H NMR detection of cerebral myo-inositol. *FEBS Lett.* (1985). doi:10.1016/0014-5793(85)81235-7
 67. Prayson, R. A. *et al.* Interobserver reproducibility among neuropathologists and surgical pathologists in fibrillary astrocytoma grading. *J. Neurol. Sci.* (2000). doi:10.1016/S0022-510X(00)00274-4
 68. Klunk, W. E., Xu, C. J., Panchalingam, K., McClure, R. J. & Pettegrew, J. W. Analysis of magnetic resonance spectra by mole percent: Comparison to absolute units. *Neurobiol. Aging* (1994). doi:10.1016/0197-4580(94)90153-8
 69. Provencher, S. W. Automatic quantitation of localized in vivo ¹H spectra with LCModel. *NMR Biomed.* (2001). doi:10.1002/nbm.698

70. Delikatny, E. J., Chawla, S., Leung, D. J. & Poptani, H. MR-visible lipids and the tumor microenvironment. *NMR in Biomedicine* (2011). doi:10.1002/nbm.1661
71. Fuentes-Fayos, A. C. *et al.* Splicing machinery dysregulation drives glioblastoma development/aggressiveness: oncogenic role of SRSF3. *Brain* (2020). doi:10.1093/brain/awaa273
72. Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A. & Stone, C. J. *Classification and regression trees. Classification and Regression Trees* (2017). doi:10.1201/9781315139470
73. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. *R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria* (2020).
74. Biernat, W. 2000 World health organization classification of tumors, of the nervous system. *Polish Journal of Pathology* (2000).
75. Hattingen, E. *et al.* Prognostic value of choline and creatine in WHO grade II gliomas. *Neuroradiology* (2008). doi:10.1007/s00234-008-0409-3
76. Tolia, M. *et al.* Prognostic value of MRS metabolites in postoperative irradiated high grade gliomas. *Biomed Res. Int.* (2015). doi:10.1155/2015/341042
77. Roldan-Valadez, E. *et al.* Choline-to-N-acetyl aspartate and lipids-lactate-to-creatine ratios together with age assemble a significant Cox's proportional-hazards regression model for prediction of survival in high-grade gliomas. *Br. J. Radiol.* (2016). doi:10.1259/bjr.20150502
78. Yamasaki, F. *et al.* Magnetic resonance spectroscopic detection of lactate is predictive of a poor prognosis in patients with diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro. Oncol.* (2011). doi:10.1093/neuonc/nor038
79. Steidl, E. *et al.* Myoinositol as a biomarker in recurrent glioblastoma treated with Bevacizumab: A 1H-magnetic resonance spectroscopy study. *PLoS One* (2016). doi:10.1371/journal.pone.0168113
80. Hattingen, E. *et al.* Phospholipid Metabolites in Recurrent Glioblastoma: In Vivo Markers Detect Different Tumor Phenotypes before and under Antiangiogenic Therapy. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0056439
81. Quon, H. *et al.* Changes in serial magnetic resonance spectroscopy

- predict outcome in high-grade glioma during and after postoperative radiotherapy. *Anticancer Res.* (2011).
82. Steffen-Smith, E. A., Shih, J. H., Hipp, S. J., Bent, R. & Warren, K. E. Proton magnetic resonance spectroscopy predicts survival in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *J. Neurooncol.* (2011).
doi:10.1007/s11060-011-0601-x
 83. Li, X. *et al.* Identification of MRI and 1H MRSI parameters that may predict survival for patients with malignant gliomas. *NMR Biomed.* (2004).
doi:10.1002/nbm.858
 84. Reijneveld, J. C., van der Grond, J., Ramos, L. M. P., Bromberg, J. E. C. & Taphoorn, M. J. B. Proton MRS imaging in the follow-up of patients with suspected low-grade gliomas. *Neuroradiology* (2005).
doi:10.1007/s00234-005-1435-z
 85. Jaskólski, D. J. *et al.* Magnetic resonance spectroscopy in intracranial tumours of glial origin. *Neurol. Neurochir. Pol.* (2013).
doi:10.5114/ninp.2013.32999
 86. Gao, W. *et al.* Cho/Cr ratio at MR spectroscopy as a biomarker for cellular proliferation activity and prognosis in glioma: correlation with the expression of minichromosome maintenance protein 2. *Acta radiol.* (2019). doi:10.1177/0284185118770899
 87. Leather, T., Jenkinson, M. D., Das, K. & Poptani, H. Magnetic resonance spectroscopy for detection of 2-hydroxyglutarate as a biomarker for IDH mutation in gliomas. *Metabolites* (2017). doi:10.3390/metabo7020029
 88. Castillo, M., Smith, J. K. & Kwock, L. Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas. *Am. J. Neuroradiol.* (2000).
 89. Pascual, J. M. *et al.* Time course of early metabolic changes following diffuse traumatic brain injury in rats as detected by 1H NMR spectroscopy. *J. Neurotrauma* (2007). doi:10.1089/neu.2006.0190
 90. Croall, I., Smith, F. E. & Blamire, A. M. Magnetic resonance spectroscopy for traumatic brain injury. *Topics in Magnetic Resonance Imaging* (2015).
doi:10.1097/RMR.0000000000000063
 91. Kim, J. H. *et al.* 3T 1H-MR spectroscopy in grading of cerebral gliomas: Comparison of short and intermediate echo time sequences. *Am. J. Neuroradiol.* (2006).

92. Natsumeda, M. *et al.* Accumulation of 2-hydroxyglutarate in gliomas correlates with survival: A study by 3.0-tesla magnetic resonance spectroscopy. *Acta Neuropathologica Communications* (2014). doi:10.1186/s40478-014-0158-y
93. Fan, G., Sun, B., Wu, Z., Guo, Q. & Guo, Y. In vivo single-voxel proton MR spectroscopy in the differentiation of high-grade gliomas and solitary metastases. *Clin. Radiol.* (2004). doi:10.1016/j.crad.2003.08.006
94. Galanaud, D. *et al.* Noninvasive diagnostic assessment of brain tumors using combined in vivo MR imaging and spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* (2006). doi:10.1002/mrm.20886
95. Opstad, K. S., Ladroue, C., Bell, B. A., Griffiths, J. R. & Howe, F. A. Linear discriminant analysis of brain tumour 1H MR spectra: A comparison of classification using whole spectra versus metabolite quantification. *NMR Biomed.* (2007). doi:10.1002/nbm.1147
96. Sabatier, J. *et al.* Characterization of choline compounds with in vitro 1H magnetic resonance spectroscopy for the discrimination of primary brain tumors. *Invest. Radiol.* (1999). doi:10.1097/00004424-199903000-00013
97. Tsun, Z. Y. & Possemato, R. Amino acid management in cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology* (2015). doi:10.1016/j.semcdb.2015.08.002
98. Elias, A. E. *et al.* MR Spectroscopy Using Normalized and Non-normalized Metabolite Ratios for Differentiating Recurrent Brain Tumor from Radiation Injury. *Acad. Radiol.* (2011). doi:10.1016/j.acra.2011.05.006
99. Khan, I., Waqas, M. & Shamim, M. S. Prognostic significance of IDH 1 mutation in patients with glioblastoma multiforme. *J. Pak. Med. Assoc.* (2017).
100. Núñez, F. J. *et al.* IDH1-R132H acts as a tumor suppressor in glioma via epigenetic up-regulation of the DNA damage response. *Sci. Transl. Med.* (2019). doi:10.1126/scitranslmed.aag1427
101. Gülten, G. *et al.* The importance of idh1, atrx and wt-1 mutations in glioblastoma. *Polish J. Pathol.* (2020). doi:10.5114/pjp.2020.97020
102. Croze, M. L. & Soulage, C. O. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie* (2013).

- doi:10.1016/j.biochi.2013.05.011
103. Lam, S. *et al.* A phase I study of myo-inositol for lung cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2006). doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0128
 104. Zhou, Y. & Danbolt, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission* (2014). doi:10.1007/s00702-014-1180-8
 105. Lenting, K. *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1-mutated human gliomas depend on lactate and glutamate to alleviate metabolic stress. *FASEB J.* **33**, 557–571 (2019).
 106. Lehnhardt, F. G., Rhn, G., Ernestus, R. I., Grne, M. & Hoehn, M. 1H-and 31P-MR spectroscopy of primary and recurrent human brain tumors in vitro: Malignancy-characteristic profiles of water soluble and lipophilic spectral components. *NMR Biomed.* (2001). doi:10.1002/nbm.708
 107. Szeliga, M. & Obara-Michlewska, M. Glutamine in neoplastic cells: Focus on the expression and roles of glutaminases. *Neurochem. Int.* (2009). doi:10.1016/j.neuint.2009.01.008
 108. Szeliga, M. & Albrecht, J. Glutamine Metabolism in Gliomas. *Adv. Neurobiol.* **13**, 259–273 (2016).
 109. Sjøbakk, T. E. *et al.* Metabolic profiling of human brain metastases using in vivo proton MR spectroscopy at 3T. *BMC Cancer* (2007). doi:10.1186/1471-2407-7-141
 110. Deberardinis, R. J. & Cheng, T. Q's next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* (2010). doi:10.1038/onc.2009.358
 111. Xiao, D. *et al.* The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications. *Amino Acids* (2016). doi:10.1007/s00726-016-2254-8
 112. Maus, A. & Peters, G. J. Glutamate and α -ketoglutarate: key players in glioma metabolism. *Amino Acids* (2017). doi:10.1007/s00726-016-2342-9
 113. Wright, A. J. *et al.* Ex-vivo HRMAS of adult brain tumours: Metabolite quantification and assignment of tumour biomarkers. *Mol. Cancer* (2010). doi:10.1186/1476-4598-9-66
 114. Wilson, M. *et al.* High resolution magic angle spinning 1H NMR of

- childhood brain and nervous system tumours. *Mol. Cancer* (2009). doi:10.1186/1476-4598-8-6
115. Lu, J. *et al.* Tumor-associated macrophage interleukin- β promotes glycerol-3-phosphate dehydrogenase activation, glycolysis and tumorigenesis in glioma cells. *Cancer Sci.* (2020). doi:10.1111/cas.14408
 116. Rusu, P. *et al.* GPD1 Specifically Marks Dormant Glioma Stem Cells with a Distinct Metabolic Profile. *Cell Stem Cell* (2019). doi:10.1016/j.stem.2019.06.004
 117. Linkous, A. G., Yazlovitskaya, E. M. & Hallahan, D. E. Cytosolic phospholipase a2 and lysophospholipids in tumor angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* (2010). doi:10.1093/jnci/djq290
 118. Wu, C. *et al.* Overexpression of the phospholipase A2 group V gene in glioma tumors is associated with poor patient prognosis. *Cancer Manag. Res.* (2019). doi:10.2147/CMAR.S199207
 119. Yang, L. & Zhang, H. Expression of Cytosolic Phospholipase A2 Alpha in Glioblastoma Is Associated With Resistance to Chemotherapy. *Am. J. Med. Sci.* (2018). doi:10.1016/j.amjms.2018.06.019
 120. Barceló-Coblijn, G. *et al.* Sphingomyelin and sphingomyelin synthase (SMS) in the malignant transformation of glioma cells and in 2-hydroxyoleic acid therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2011). doi:10.1073/pnas.1115484108
 121. Gramatzki, D. *et al.* Glioma Cell Death Induced by Irradiation or Alkylating Agent Chemotherapy Is Independent of the Intrinsic Ceramide Pathway. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0063527
 122. Ye, J. *et al.* Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia. *Cancer Discov.* (2014). doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0250
 123. Kinoshita, Y. & Yokota, A. Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vitro proton magnetic resonance spectroscopy. *NMR Biomed.* (1997). doi:10.1002/(SICI)1099-1492(199701)10:1<2::AID-NBM442>3.0.CO;2-N
 124. Davies, N. P. *et al.* Non-invasive detection of glycine as a biomarker of malignancy in childhood brain tumours using in-vivo ¹H MRS at 1.5 Tesla confirmed by ex-vivo high-resolution magic-angle spinning NMR. *NMR*

- Biomed.* (2010). doi:10.1002/nbm.1432
125. Babourina-Brooks, B. *et al.* Glycine: A non-invasive imaging biomarker to aid magnetic resonance spectroscopy in the prediction of survival in paediatric brain tumours. *Oncotarget* (2018). doi:10.18632/oncotarget.24789
126. Lenting, K. *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1-mutated human gliomas depend on lactate and glutamate to alleviate metabolic stress. *FASEB J.* (2019). doi:10.1096/fj.201800907RR
127. Hahn, M. K. & Blakely, R. D. The functional impact of SLC6 transporter genetic variation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (2007). doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105242
128. Metzler, R., Meleshkevitch, E. A., Fox, J., Kim, H. & Boudko, D. Y. An SLC6 transporter of the novel B₀,⁻ system aids in absorption and detection of nutrient amino acids in *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Biol.* (2013). doi:10.1242/jeb.081497
129. Banaschak, S., Rzanny, R., Reichenbach, J. R., Kaiser, W. A. & Klein, A. Estimation of postmortem metabolic changes in porcine brain tissue using 1H-MR spectroscopy - Preliminary results. *Int. J. Legal Med.* (2005). doi:10.1007/s00414-004-0495-7
130. Barton, S. J. *et al.* Comparison of in vivo 1H MRS of human brain tumours with 1H HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples in vitro. *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.* (1999). doi:10.1016/S1352-8661(99)00020-4
131. Behar, K. L. & Ogino, T. Characterization of macromolecule resonances in the 1H NMR spectrum of rat brain. *Magn. Reson. Med.* (1993). doi:10.1002/mrm.1910300107
132. Bellacosa, A., Kumar, C. C., Cristofano, A. Di & Testa, J. R. Activation of AKT kinases in cancer: Implications for therapeutic targeting. *Advances in Cancer Research* (2005). doi:10.1016/S0065-230X(05)94002-5
133. Chen, C. *et al.* Overexpression of SLC6A1 associates with drug resistance and poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer* (2020). doi:10.1186/s12885-020-06776-7
134. Benarroch, E. E. N-Acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate: Neurobiology and clinical significance. *Neurology* (2008).

doi:10.1212/01.wnl.0000311267.63292.6c

135. Bhakoo, K. K., Williams, S. R., Florian, C. L., Land, H. & Noble, M. D. Immortalization and transformation are associated with specific alterations in choline metabolism. *Cancer Res.* (1996).
136. Ren, P., Wei, J., Yu, H. & Dong, B. Identification and functional characterization of solute carrier family 6 genes in *Ciona savignyi*. *Gene* (2019). doi:10.1016/j.gene.2019.04.056
137. Romeo, S. G. *et al.* miRNA regulation of Sirtuin-1 expression in human astrocytoma. *Oncol. Lett.* (2016). doi:10.3892/ol.2016.4960
138. Qu, Y. *et al.* SIRT1 promotes proliferation and inhibits apoptosis of human malignant glioma cell lines. *Neurosci. Lett.* (2012). doi:10.1016/j.neulet.2012.07.025
139. Song, N. Y. & Surh, Y. J. Janus-faced role of SIRT1 in tumorigenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2012). doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06762.x
140. Chang, C. J. *et al.* Enhanced radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in glioma CD133-positive cells by knockdown of SirT1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009). doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.040
141. Liu, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* (2006). doi:10.1186/1476-4598-5-67
142. Firestein, R. *et al.* The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One* (2008). doi:10.1371/journal.pone.0002020
143. Wang, R. H. *et al.* Impaired DNA Damage Response, Genome Instability, and Tumorigenesis in SIRT1 Mutant Mice. *Cancer Cell* (2008). doi:10.1016/j.ccr.2008.09.001
144. Yao, Z. Q. *et al.* A novel small-molecule activator of Sirtuin-1 induces autophagic cell death/mitophagy as a potential therapeutic strategy in glioblastoma article. *Cell Death Dis.* (2018). doi:10.1038/s41419-018-0799-z
145. Ye, T. *et al.* Sirtuin1 activator SRT2183 suppresses glioma cell growth involving activation of endoplasmic reticulum stress pathway. *BMC Cancer* (2019). doi:10.1186/s12885-019-5852-5

146. Wang, H. *et al.* miR-422a inhibits glioma proliferation and invasion by targeting IGF1 and IGF1R. *Oncol. Res.* (2017).
doi:10.3727/096504016X14732772150389
147. Pollak, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Reviews Cancer* (2008). doi:10.1038/nrc2536
148. Pollak, M. N., Schernhammer, E. S. & Hankinson, S. E. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature Reviews Cancer* (2004).
doi:10.1038/nrc1387
149. Wang K, H. R. Receptor tyrosine kinase expression in high-grade gliomas before and after chemoradiotherapy. *Oncol. Lett.* **18**, 6509–6515 (2019).
150. Schito, L. & Semenza, G. L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends in Cancer* (2016).
doi:10.1016/j.trecan.2016.10.016
151. Li, Z. *et al.* Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell* (2009). doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018
152. Chen, W. *et al.* Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature* (2016). doi:10.1038/nature19796
153. Oudard, S. *et al.* Gliomas are driven by glycolysis: Putative roles of hexokinase, oxidative phosphorylation and mitochondrial ultrastructure. *Anticancer Res.* (1997).
154. Smith, T. A. D. Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *British Journal of Biomedical Science* **57**, 170–178 (2000).
155. Liu, H. *et al.* Hexokinase 2 (HK2), the tumor promoter in glioma, is downregulated by miR-218/Bmi1 pathway. *PLoS One* (2017).
doi:10.1371/journal.pone.0189353
156. Imle, R. *et al.* ADP-dependent glucokinase regulates energy metabolism via ER-localized glucose sensing. *Sci. Rep.* (2019). doi:10.1038/s41598-019-50566-6
157. Tandon, A., Birkenhagen, J., Nagalla, D., Kölker, S. & Sauer, S. W. ADP-dependent glucokinase as a novel onco-target for haematological malignancies. *Sci. Rep.* (2020). doi:10.1038/s41598-020-70014-0
158. Koguchi, T., Tanikawa, C., Mori, J., Kojima, Y. & Matsuda, K. Regulation of myo-inositol biosynthesis by p53-ISYNA1 pathway. *Int. J. Oncol.* (2016). doi:10.3892/ijo.2016.3456

8. ANEXOS



Assessment of Overall Survival in Glioma Patients as Predicted by Metabolomic Criteria

María L. Gandía-González^{1*}, Sebastián Cerdán², Laura Barrios³, Pilar López-Larrubia², Pablo G. Feijó¹, Alexis Palpan Jr.¹, José M. Roda¹ and Juan Solivera⁴

¹ Department of Neurosurgery, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain, ² Institute of Biomedical Research “Alberto Sols” CSIC/UAM, Madrid, Spain, ³ Department of Statistics CSIC, Madrid, Spain, ⁴ Department of Neurosurgery, University Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Bo Gao,

Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, China

Reviewed by:

Bihong T. Chen,

City of Hope National Medical Center, United States

Ru Jia Wang,

Tangshan Gongren Hospital, China

*Correspondence:

María L. Gandía-González
marisagg4@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to Cancer Imaging and Image-directed Interventions, a section of the journal *Frontiers in Oncology*

Received: 13 February 2019

Accepted: 11 April 2019

Published: 10 May 2019

Citation:

Gandía-González ML, Cerdán S, Barrios L, López-Larrubia P, Feijó PG, Palpan A Jr, Roda JM and Solivera J (2019) Assessment of Overall Survival in Glioma Patients as Predicted by Metabolomic Criteria. *Front. Oncol.* 9:328. doi: 10.3389/fonc.2019.00328

Objective: We assess the efficacy of the metabolomic profile from glioma biopsies in providing estimates of postsurgical Overall Survival in glioma patients.

Methods: Tumor biopsies from 46 patients bearing gliomas, obtained neurosurgically in the period 1992–1998, were analyzed by high resolution ¹H magnetic resonance spectroscopy (HR-¹H MRS), following retrospectively individual postsurgical Overall Survival up to 720 weeks.

Results: The Overall Survival profile could be resolved in three groups; Short (shorter than 52 weeks, $n = 19$), Intermediate (between 53 and 364 weeks, $n = 19$) or Long (longer than 365 weeks, $n = 8$), respectively. Classical histopathological analysis assigned WHO grades II–IV to every biopsy but notably, some patients with low grade glioma depicted unexpectedly Short Overall Survival, while some patients with high grade glioma, presented unpredictably Long Overall Survival. To explore the reasons underlying these different responses, we analyzed HR-¹H MRS spectra from acid extracts of the same biopsies, to characterize the metabolite patterns associated to OS predictions. Poor prognosis was found in biopsies with higher contents of alanine, acetate, glutamate, total choline, phosphorylcholine, and glycine, while more favorable prognosis was achieved in biopsies with larger contents of total creatine, glycerol-phosphorylcholine, and myo-inositol. We then implemented a multivariate analysis to identify hierarchically the influence of metabolomic biomarkers on OS predictions, using a Classification Regression Tree (CRT) approach. The CRT based in metabolomic biomarkers grew up to three branches and split into eight nodes, predicting correctly the outcome of 94.7% of the patients in the Short Overall Survival group, 78.9% of the patients in the Intermediate Overall Survival group, and 75% of the patients in the Long Overall Survival group, respectively.

Conclusion: Present results indicate that metabolic profiling by HR-¹H MRS improves the Overall Survival predictions derived exclusively from classical histopathological gradings, thus favoring more precise therapeutic decisions.

Keywords: classification decision tree, glioma, metabolomic profile, high resolution proton magnetic resonance spectroscopy, overall survival

INTRODUCTION

Gliomas are the most frequent primary brain tumors, currently managed through surgical resection, radiotherapy, and chemotherapy (1) approaches, but leading inevitably to large disability and mortality outcomes. The selection of the recommended therapeutic intervention in each case relies in estimates overall survival (OS) based commonly in histopathological and genetic criteria. However, current assessments of OS entail considerable uncertainties, limiting concomitantly more precise, effective, and personalized therapies. On these grounds, exploring additional criteria to improve OS predictions acquires vital relevance to improve treatment outcomes in glioma patients.

Histopathological and immunohistochemical criteria have classically provided the basis for the initial WHO classification of gliomas in grades I-IV (2, 3) determining, in general terms, the OS estimate and the recommended therapeutic intervention. More recently, the 2016 WHO classification of central nervous system tumors added an important collection of molecular signatures, restructuring the original histopathological classification of gliomas to include subgroups with specific genetic profiles (4). Although these refinements considerably improved the precision in the treatment prescribed, as well as our knowledge of glioma physiopathology and classification, the limited reproducibility of histopathological evaluations lead, not unfrequently, to imprecise histopathological classification and unreliable OS predictions at the individual level (5–7).

Magnetic Resonance Imaging approaches have been currently used to assess OS of gliomas. Briefly, radiomic parameters including surface area (8), shape features (9), tumor, and necrosis volumes, necrosis-tumor ratio (10) have been used to evaluate OS. However, these studies became many times limited to short OS periods as they evaluated only glioblastoma multiforme cases.

The metabolomic profiles of gliomas are able to provide an additional source of information to improve OS predictions, evaluating the down-stream metabolic alterations of aberrant cellularity and gene expression (11). Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) has been shown to be well-endowed to provide the metabolic profile of gliomas both *in vivo* and *in vitro* (12, 13). Briefly, *in vivo* ¹H MRS revealed non-invasively, important hallmarks of cancer, including alterations in pH homeostasis (14), energy related (15), and phospholipid metabolites (16, 17), an ensemble of valuable metabolic fingerprints to classify high grade (HGG) or low grade gliomas

(LGG) (16, 18). Moreover, the metabolic profiles determined by ¹H MRS *in vivo* reached considerable clinical prognostic relevance (19–22). Alternatively, complementary *in vitro* HR-¹H MRS approaches have proved to be able to resolve a larger number of metabolites than *in vivo* ¹H MRS, thus increasing the size of the metabolome investigated, the number of potential alterations detected, and their influence on the tumoral phenotype, at the expense of the more invasive *in vitro* methodology (23, 24). However, the predictive role of the metabolomic profiles obtained by HR-¹H MRS in providing OS estimates, received considerably less attention.

On these grounds, we aimed here to provide a pilot study evaluating OS estimates derived from metabolomic biomarkers as detected by HR-¹H MRS, using a retrospective database of human glioma biopsies.

MATERIALS AND METHODS

Glioma Patients and Tumor Biopsies

This study was approved by the Ethics Committee of Clinical Research from the University Hospital La Paz (http://www.madrid.org/cs/Satellite?language=es&pagename=HospitalLaPaz/Page/HPAZ_home) and carried out following their recommendations. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. We retrospectively reviewed the database of the Neurosurgery Department of the University Hospital La Paz, selecting 66 consecutive patients with glioma (grades I-IV) who underwent neurosurgery during the period 1992–1998 (Figure 1). Briefly, solid parts of glioma tumors were extracted from the brain without the use of bipolar coagulation and divided into two adjacent and similar portions, one of them used for HR-¹H MRS analysis and the other for histopathological diagnosis, following available WHO criteria (25). Tumor characteristics were evaluated by two independent radiologists and classified according to size, localization, and eloquence (26). Patients lost in follow up ($n = 10$) and those undergoing surgery for recurrence ($n = 7$) were excluded from further analysis. Grade I gliomas ($n = 3$) were also excluded because of their well-known physiopathological differences with the other glioma grades (27, 28). We then recovered the individual demographic, clinical, histopathological and *in vitro* spectroscopic ¹H NMR features and gathered the OS information on postsurgical outcomes of these patients, including relevant clinical symptoms, adjuvant therapies, and OS time. No missing data for the variables of interest were found in these patients.

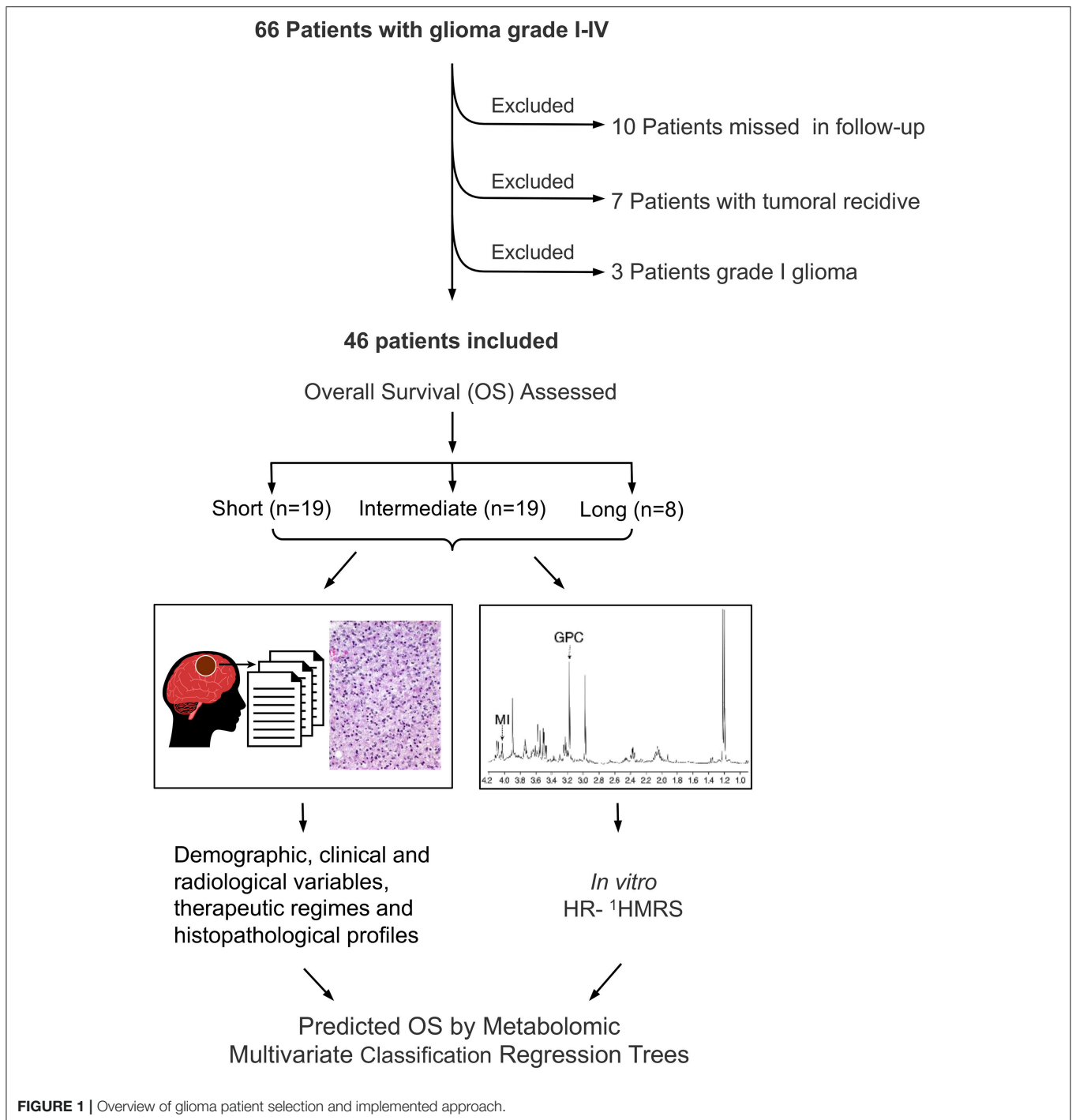
Histopathological Criteria

Histopathological grading of the biopsies was provided by the Anatomopathology Department of the Hospital, following standard WHO criteria (25), and archived until used in this study.

HR-¹H MRS

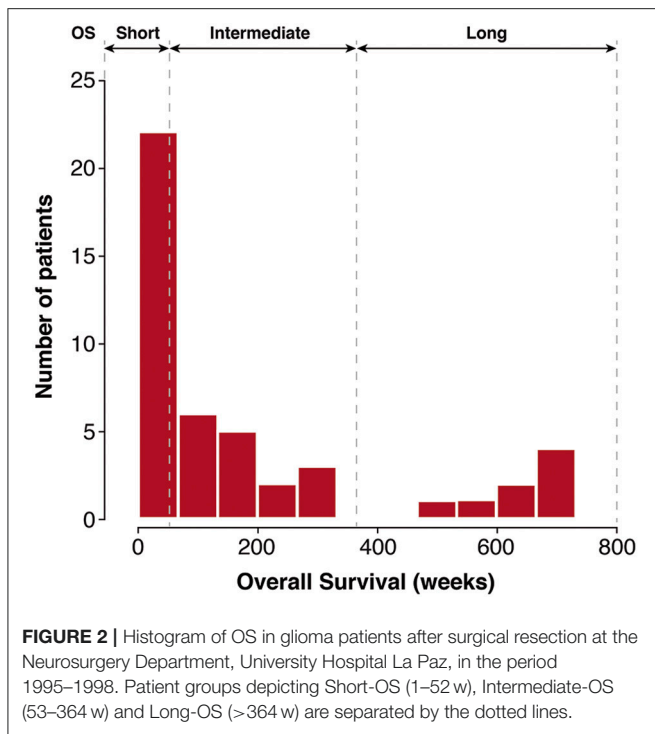
The ¹H MRS biopsy was immediately frozen in liquid nitrogen (−169°C) in the operating room of the Hospital and stored at −82°C until transferred in a liquid nitrogen container to the Institute of Biomedical Research CSIC/UAM for further

Abbreviations: Ac, Acetate; Ala, Alanine; Asp, aspartic acid; Cr, creatine; CCM, classification confusion matrix; CRT, Classification Regression Tree; d, doublet multiplicity; dd, doublet of doublets multiplicity; fCho, free choline; GABA, gamma-aminobutyric acid; GLM, General Linear Model; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Gly, glycine; GPC, glycerophosphocholine; GroPEtn, glycerophosphoethanolamine; HGG, high grade glioma ¹H MRS, proton magnetic resonance spectroscopy; Lac, lactate; LGG, low grade glioma; Lip, lipid; m, multiplet; MRS, magnetic resonance spectroscopy; MI, myo-inositol; NAA, N-acetyl-aspartic acid; OS, overall survival; PC, phosphorylcholine; PCr, phosphocreatine; PDE, phosphodiester; PE, phosphoethanolamine; PtdCho, phosphatidylcholine; PtdEtn, phosphatidylethanolamine; PtdIns, phosphatidylinositol; s, singlet multiplicity SEM, Standard error of mean; t, triplet; Tau, taurine; tCho, total choline; tCr, total creatine; Val, valine; w, weeks.



processing and NMR analysis. Briefly, biopsies were reduced to powder in a previously chilled (methanol/dry ice) mortar, extracted with 6% perchloric acid, neutralized with KOD, lyophilized and resuspended in D₂O (99.9% D) for ¹H MRS analysis (12). HR-¹H MRS spectra of biopsy extracts were acquired at 8.4 Tesla (360.13 MHz, pH 7.2, 22°C) in a Bruker AM-360 spectrometer equipped with a commercial ¹H selective

probe using 5-mm tubes and 0.5 ml of tissue extract. Acquisition conditions were: 90° pulses, 16.9 s total cycle time and 16,384 data points acquired in the time domain during of 1.901 s. The intensity of the residual water resonance was further reduced using a 5 s presaturating pulse centered on the water frequency. Prior to Fourier transformation, the free induction decays were zero-filled up to 128 K and multiplied by an exponential



function resulting in 0.5 Hz artificial line broadening in the transformed spectrum. Further spectral processing, including phase and baseline corrections were performed by the same operator. Chemical shifts were referred to the methyl signal of TSP (2,2'-3,3' tetradeutero trimethyl-silyl propionate sodium salt) at 0 ppm as an internal reference.

The following metabolites (resonances used in quantification, number of protons originating the resonance, multiplicity) could be consistently identified in the high resolution proton spectrum (29): Valine (1.09 ppm, 3H, d), Lactate (1.35 ppm, 3H, d), Alanine (1.45 ppm, 3H, d), Acetate (1.93 ppm, 3H, s), N-acetyl-aspartic acid (2.01 ppm, 3H, s), Gamma-amino butyric acid (2.31 ppm, 2H, t), Glutamate (2.43 ppm, 2H, m), Glutamine (2.45 ppm, 2H, m), Aspartic acid (2.80 ppm, 2H, dd), Creatine (3.05 ppm, 3H, s) and Phosphocreatine (3.055 ppm, 3H, s), free Choline (3.20 ppm, 9H, s), Phosphorylcholine (3.22 ppm, 9H, s), Glycerophosphorylcholine (3.25 ppm, 9H, s), Taurine (3.45 ppm, 2H, t), Glycine (3.55 ppm, 2H, s), and Myo-inositol 4.07 ppm, 1H, dd). For every one of these metabolites, lorentzian curves were fitted to the most conveniently resolved proton resonances, and the resulting integral divided by the total number of protons of the corresponding metabolite (6). These values were further standardized by the sum of all the measured metabolites in the HR-¹H NMR spectra and expressed as a molar percentage

TABLE 1 | Clinical features and overall survival of glioma patients.

Feature	Overall survival			Total patients n (% column)	Chi-square (montecarlo sig.)	
	Short n (% row)	Intermediate n (% row)	Long n (% row)			
Age	<25 y	0 (0.0%)	5 (62.5%)	3(37.5%)	8 (17.4%)	0.01
	25–54 y	5 (31.3%)	7 (43.8%)	4(25%)	16 (34.8%)	
	>54 y	14 (63.6%)	7 (31.8%)	1 (4.5%)	22 (47.8%)	
Sex	Female	8 (34.8%)	11(47.8%)	4 (17.4%)	23 (50%)	0.74
	Men	11(47.8%)	8 (34.8%)	4 (17.4%)	23 (50%)	
Comorbidity ^a	Yes	10 (34.5%)	13 (44.8%)	6 (20.7%)	29 (63%)	0.56
	No	9 (52.9%)	6 (35.3%)	2 (11.8%)	17 (37%)	
Localization ^b	A	2 (15.4%)	7 (53.8%)	4 (30.8%)	13 (30.2%)	0.04
	B	5 (41.7%)	6 (50%)	1 (8.3%)	12 (27.9%)	
	C	12 (66.7%)	3 (16.7%)	3 (16.7%)	18 (41.9%)	
Tumor volume ^b	Small	13 (39.4%)	15 (45.5%)	5 (15.2%)	33 (73.3%)	0.49
	Big	6 (50%)	3 (25%)	3 (25%)	12 (26.7%)	
Eloquency ^b	Yes	16 (53.3%)	10 (33.3%)	4 (13.3%)	30 (69.8%)	0.19
	No	3 (23.1%)	6 (46.2%)	4(30.8 %)	13 (30.2%)	
Resection	Partial/Complete	10 (52.6%)	5 (26.3%)	4 (21.1%)	19 (41.3%)	0.27
	Biopsy	9 (33.3%)	14 (51.9%)	4 (14.8%)	27 (58.7%)	
Radiotherapy	Yes	19 (54.3%)	12 (34.3%)	4 (11.4%)	35 (76.1%)	0.003
	No	0 (0%)	7 (63.6%)	4 (36.4%)	11 (23.9%)	
Chemotherapy	Yes	0 (0%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	3 (6.5%)	0.07
	No	19(44.2%)	18 (41.9%)	6 (14%)	43 (93.5%)	
Histopathology grade ^c	II	0 (0%)	6 (54.5%)	5 (45.5%)	11 (23.9%)	<0.001
	III	3 (18.8%)	10 (62.5%)	3 (18.8%)	16 (34.8%)	
	IV	16(84.2%)	3 (15.8%)	0 (0%)	19 (41.3%)	

^aArterial hypertension, diabetes mellitus and/or pulmonary, renal, cardiac, oncologic or any severe disease, ^bClassification of tumors according to (26). ^cHistopathologic grade according to (3).

(18, 30). Assignments were performed with the aid of chemical shift values reported in the literature (29, 31) and confirmed when necessary by the addition of authentic standards.

Statistical Methods

Statistical analyses were performed using the IBM SPSS Statistics 24 package as implemented on an Intel-PC platform, operating under Windows 10 environment. Univariate statistical approaches provided means and standard errors for the molar fractions of every metabolite. To investigate statistical dependences between clinical features and groups of OS, we used asymptotic chi-square with Monte Carlo exact probability tests, and to test the differences of means within each metabolic variable through the OS groups, we used the ANOVA test and Student *t*-tests. Finally, to explore the hierarchical contribution of individual HR-¹H MRS biomarkers to the three groups of OS, we implemented a multivariate Classification Regression Tree (CRT) (32), classifying automatically the database using hierarchical nodes and branches, selecting step-wise the optimal discriminant biomarker for each split from the collection of available HR-¹H MRS variables. The dependent variable was OS, using Chi-squared Automatic Interaction Detection (CHAID) as a growing method to provide automatically the optimal splits in every branch. Finally, we used these results to generate a Classification-Confusion Matrix (CCM), summarizing the correct and incorrect classifications provided by the metabolomics CRT, yielding the global percentage of correct classifications. Statistical significance in the ANOVA and multivariate analysis was defined as $p = 0.05$, considering confidence intervals higher than 95%.

RESULTS

Glioma Database

We investigated 46 patients (23 males, 23 females) with a median age of 49 years, presenting the following glioma grade distribution; Grade II (11 cases), Grade III (16 cases), and Grade IV (19 cases). The database of glioma patients (Figure 2) showed two clearly separated groups by OS, either depicting a Long Overall Survival (Long-OS) that survive more than 364 weeks (w), or less. The latter group, including patients with a wide range of survival (1–364 w), was further divided in two groups using the median of survival as a cut-point, resulting in Short Overall Survival (Short-OS) patients (1–52 w), or Intermediate Overall Survival (Intermediate-OS) patients (53–364 w), respectively.

Demographic, clinical, and radiological variables, therapeutic regimes and histopathological profiles of these groups are summarized in Table 1. A Chi-square Monte Carlo test was performed to compare the differences in independent clinical variables among the three survival categories. Radiotherapy, histopathologic grade, age, and localization showed statistically significant influence on OS.

HR-¹H MRS

An illustrative example of underdetermined histopathological OS prediction is provided in Figure 3, showing representative

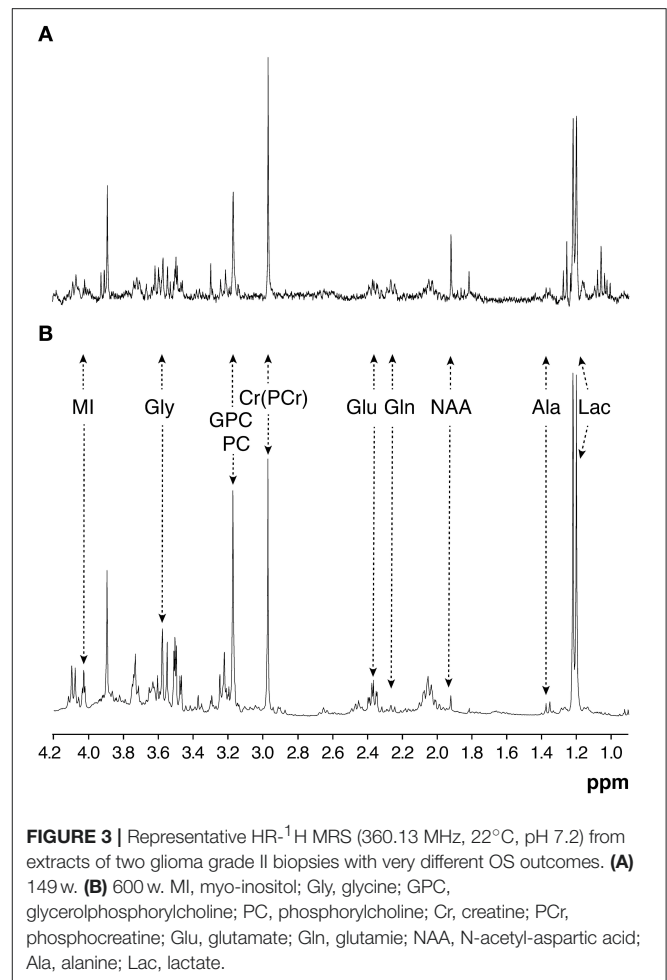


FIGURE 3 | Representative HR-¹H MRS (360.13 MHz, 22°C, pH 7.2) from extracts of two glioma grade II biopsies with very different OS outcomes. **(A)** 149 w. **(B)** 605 w. MI, myo-inositol; Gly, glycine; GPC, glycerolphosphorylcholine; PC, phosphocholine; Cr, creatine; PCr, phosphocreatine; Glu, glutamate; Gln, glutamine; NAA, N-acetyl-aspartic acid; Ala, alanine; Lac, lactate.

HR-¹H MRS spectra from extracts of glioma biopsies obtained from two young male patients, assigned the same histopathological Grade II, but resulting in very different OS. Despite both patients underwent complete surgical resection without adjuvant radio- or chemotherapy, the patient represented in Figure 3A, survived <3 years (149 w), while the patient represented by Figure 3B survived more than 11 years (605 w).

Interestingly, HR-¹H MRS spectra of these biopsies disclosed remarkable differences, particularly the relative increases in myo-inositol (MI) and glycerol-phosphorylcholine (GPC) in Figure 3B. These findings suggested that HR-¹H MRS analysis of biopsy extracts could contribute additional OS criteria to those normally obtained from general histopathological classification, thus prompting further HR-¹H MRS analyses of the database.

Univariate Statistics

OS was well-reflected in the metabolic profiles obtained, with evident relationships between OS and specific metabolite changes (Figure 4). Table 2 provides a more detailed analysis of the relationship between OS and specific metabolite molar fractions,

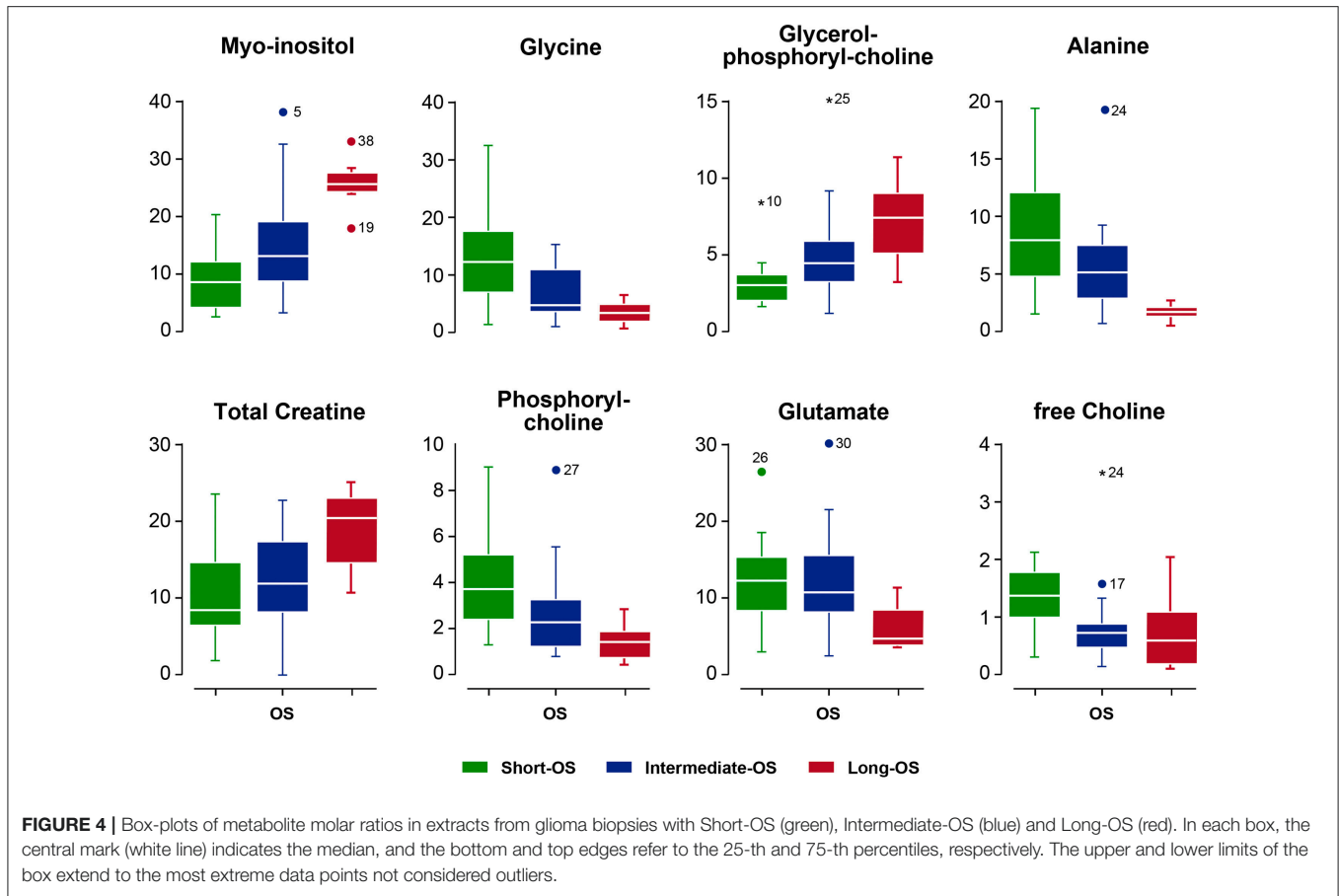


FIGURE 4 | Box-plots of metabolite molar ratios in extracts from glioma biopsies with Short-OS (green), Intermediate-OS (blue) and Long-OS (red). In each box, the central mark (white line) indicates the median, and the bottom and top edges refer to the 25-th and 75-th percentiles, respectively. The upper and lower limits of the box extend to the most extreme data points not considered outliers.

TABLE 2 | General linear model analysis of OS in glioma patients as revealed by the metabolic profile determined by HR-1H MRS.

Metabolite	Short (n = 19)	Intermediate (n = 19)	Long (n = 8)	Total	F ^b	p
OVERALL SURVIVAL^a						
MI	9.03 ± 1.26	14.75 ± 2.14	25.72 ± 1.51	14.30 ± 1.36	15.10	<0.001
Ala	8.47 ± 1.12	5.67 ± 0.95	1.67 ± 0.24	6.13 ± 0.70	13.65	<0.001
GPC	3.17 ± 0.34	5.17 ± 0.72	7.18 ± 0.97	4.70 ± 0.42	9.44	<0.001
Gly	13.38 ± 1.89	6.95 ± 1.03	3.61 ± 0.68	9.03 ± 1.05	9.37	<0.001
PC	4.17 ± 0.48	2.84 ± 0.48	1.43 ± 0.28	3.14 ± 0.32	8.36	0.001
tCr	13.36 ± 1.10	15.03 ± 1.19	20.84 ± 1.63	15.35 ± 0.81	6.53	0.003
Ac	4.49 ± 0.97	3.09 ± 0.81	0.94 ± 0.17	3.30 ± 0.55	5.72	0.006
fCho	1.33 ± 0.13	0.86 ± 0.17	0.73 ± 0.24	1.03 ± 0.10	4.65	0.01
Glu	12.20 ± 1.27	12.09 ± 1.56	6.04 ± 1.16	11.08 ± 0.91	3.62	0.03
Gln	15.47 ± 1.19	18.76 ± 1.38	18.51 ± 1.30	17.36 ± 0.81	2.02	0.14
Val	2.34 ± 0.47	1.60 ± 0.43	1.45 ± 0.23	1.88 ± 0.27	0.896	0.42
Asp	0.77 ± 0.14	0.70 ± 0.14	0.50 ± 0.12	0.69 ± 0.09	0.584	0.56
NAA	3.35 ± 0.94	4.57 ± 0.95	4.55 ± 0.94	4.06 ± 0.57	0.544	0.58
GABA	1.25 ± 0.31	0.92 ± 0.15	1.17 ± 0.33	1.10 ± 0.15	0.483	0.62
Tau	5.69 ± 0.79	6.17 ± 0.71	4.95 ± 0.63	5.76 ± 0.45	0.416	0.66
tCho	8.67 ± 0.57	8.88 ± 0.76	9.33 ± 1.02	8.87 ± 0.42	0.145	0.86

^aResults are given as mean ± standard error of mean. ^bA Box Cox transform was performed on the data before running ANOVA analysis. Ac, Acetate; Ala, Alanine; Asp, aspartic acid; fCho, free choline; GABA, gamma-aminobutyric acid; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Gly, glycine; GPC, glycerophosphocholine; MI, myo-inositol; NAA, N-acetyl-aspartic acid; PC, phosphorylcholine; Tau, taurine; tCr, total creatine; Val, valine. Bold characters indicate p < 0.05.

TABLE 3 | General linear model analysis of the HR-¹H NMR metabolic profiles associated to different glioma histopathological grades.

	IV <i>n</i> = 11	III <i>n</i> = 16	II <i>n</i> = 19	Total	F	p
HISTOPATHOLOGICAL GRADE^a						
MI	8.41 ± 1.09^b	13.94 ± 1.95	24.99 ± 2.3	14.3 ± 1.36	21.71^c	<0.000
PC	4.36 ± 0.56	2.90 ± 0.36	1.40 ± 0.25	3.14 ± 0.32	11.74	<0.000
GPC	3.01 ± 0.19	5.32 ± 0.84	6.70 ± 0.87	4.70 ± 0.42	9.16	<0.000
Ala	8.36 ± 1.15	5.77 ± 1.09	2.82 ± 0.69	6.13 ± 0.7	8.85	0.001
Gly	12.74 ± 1.9	7.98 ± 1.42	4.14 ± 0.53	9.03 ± 1.05	6.54	0.003
tCr	13.54 ± 1.17	14.35 ± 1.31	19.94 ± 1.28	15.35 ± 0.81	6.30	0.004
Glu	13.85 ± 1.55	10.89 ± 1.32	6.59 ± 0.95	11.08 ± 0.91	5.90	0.005
Succ	1.36 ± 0.49	1.11 ± 0.2	0.58 ± 0.08	1.09 ± 0.22	3.99	0.03
Gln	14.95 ± 1.14	19.05 ± 1.31	19.05 ± 1.67	17.36 ± 0.81	3.47	0.04
fCho	1.23 ± 0.13	1.05 ± 0.21	0.67 ± 0.16	1.03 ± 0.1	3.10	0.05
Val	2.32 ± 0.48	1.97 ± 0.49	0.98 ± 0.11	1.88 ± 0.27	2.51	0.09
Asp	0.88 ± 0.16	0.63 ± 0.12	0.47 ± 0.12	0.69 ± 0.09	1.93	0.16
Ac	3.75 ± 0.96	3.68 ± 0.98	1.95 ± 0.67	3.30 ± 0.55	1.49	0.24
Tau	6.09 ± 0.85	6.05 ± 0.74	4.77 ± 0.46	5.76 ± 0.45	0.42	0.66
tCho	8.60 ± 0.57	9.27 ± 0.86	8.76 ± 0.83	8.87 ± 0.42	0.24	0.79
GABA	1.03 ± 0.19	1.25 ± 0.36	1.02 ± 0.23	1.10 ± 0.15	0.23	0.80
NAA	4.14 ± 1.17	4.06 ± 0.86	3.94 ± 0.49	4.06 ± 0.57	0.01	0.99

^aAccording to Louis et al. (3) ^bResults are given as mean ± standard error of mean. ^cA Box Cox transform was performed on the data before running ANOVA analysis. Bold characters indicate *p* < 0.05.

highlighting the discriminant power in OS of each metabolite (*F*-value) and its statistical significance (*p*-value) as derived from ANOVA tests.

Briefly, OS increased with increasing levels of MI, GPC, and total Creatine (tCr), and decreased with increasing levels of alanine (Ala), free choline (fCho), glutamate (Glu), phosphorylcholine (PC), and glycine (Gly). The remaining metabolites detected by HR-¹H NMR, including acetate (Ac), glutamine (Gln), valine (Val), aspartate (Asp), N-acetyl-aspartic acid (NAA), Gamma-amino butyric (GABA), taurine (Tau), and total choline (tCho) were not found to influence significantly OS. The most powerful discriminators of OS were (Metabolite/ *F* value/ *p*-value) in decreasing order; MI/15.1/0.000, Ala/13.6/0.000, GPC/9.5/0.001, Gly/9.4/0.000, tCr/6.5/0.003, Ac/5.7/0.006, fCho/4.6/0.015, Glu/3.6/0.035.

We also investigated the relationship between histopathological grade and the molar fractions of metabolites detectable in extracts glioma biopsies using ANOVA tests (Table 3). Notably, the priority of metabolites providing optimal glioma grade discrimination, was different from the one yielding optimal OS discriminative power (Table 2). The following molar ratios of metabolites were found to provide optimal discriminant power between histopathological grades (metabolite/*F*-value/*p*-value); MI/21.7/0.000, PC/11.7/0.000, GPC/9.2/0.000, Ala/8.8/0.001, Gly/6.5/0.003, tCr/6.3/0.004, Glu 5.9/0.005 and Gln/3.5/0.040.

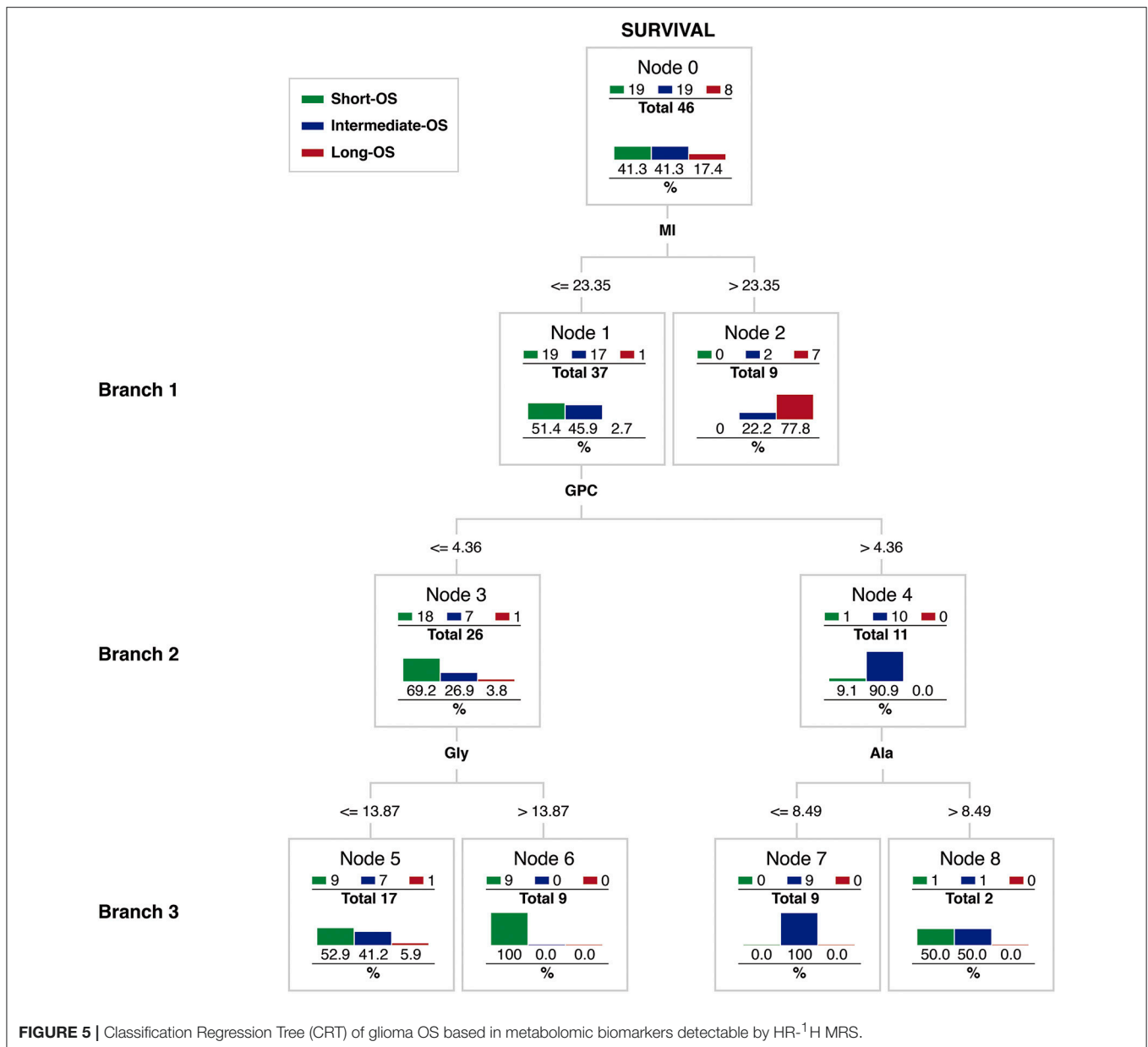
Together, these results show that relevant metabolites contribute with different strengths either to histopathological grading or to OS predictions.

Classification Regression Trees (CRT)

To investigate the hierarchical contribution of these metabolites to the OS observed, we implemented a multivariate CRT (Figure 5) (32). Starting with the complete patient database (Node 0), high MI levels (Branch 1) provided the most powerful biomarker to predict Long-OS survival within the three OS groups. MI levels ≤23.35 were found in 37 biopsies (Node 1). Of these, only one patient survived more than 7 years (Long-OS), while the rest of the patients depicted either Intermediate- (17 patients) or Short-OS (19 patients). In contrast, MI levels >23.35 were detected in nine biopsies (Node 2), of which seven (77.8%) depicted Long-OS, two showed Intermediate-OS, and none had a Short-OS, suggesting that high MI levels dismiss a Short-OS prediction.

Patients with MI levels ≤23.35 could be further split in two groups using GPC (Branch 2). Sixty-nine percent of the patients with GPC levels ≤4.36 (Node 3) were classified as Short-OS, while 91% of the patients with GPC > 4.36 (Node 4) were classified as Intermediate-OS. GPC provided thus a convenient biomarker to distinguish between Short- and Intermediate-OS estimates.

The metabolomic CRT grew beyond Branch 2, improving the classification using either Gly or Ala splits (Branch 3). All patients of Node 3 with Gly levels higher 13.87 (Node 6), depicted Short-OS, suggesting that high Gly levels are predictive of a negative outcome. Patients from Node 4, could be further stratified by their Ala levels. Those having Ala levels lower than 8.48 (Node 7) indicated Intermediate-OS (100%). Summarizing, the metabolomic CRT indicated dominant roles of MI, GPC, Ala, and Gly OS prediction of glioma patients.



Finally, we compared the number of correct predictions derived from the metabolomic CRT with those observed clinically, in the Classification-Confusion Matrix of **Table 4**. Out of 19 patients in the Short-OS group, the metabolomic approach classified correctly 18 patients. In the Intermediate-OS group, the metabolomic approach classified correctly 15 of 19 patients. Finally, out of the 8 patients identified with Long-OS, the metabolomic approach correctly classified 6 patients.

In summary, the metabolomic classification reached defined OS predictions in all three groups, separating well the longer OS groups (Intermediate-OS and Long-OS). This entails considerable relevance, since the prediction of Long-OS in glioma patients remains currently a vital challenge for

neurosurgeons, with important implications in the definition of the recommended therapeutic strategy.

DISCUSSION

Previous OS Studies

The present study complements and extends earlier OS predictors based on the WHO classification (2–4) or *in vivo* MRI/MRS studies (19–21, 33–40), contributing a novel array of metabolomic biomarkers organized hierarchically by a multivariate CRT. Earlier studies implementing *in vivo* MRS/MRI approaches investigated mainly glioblastoma patients (**Table 5**), associating Short-OS to increases in PC (4) and tCho/NAA (20, 36–40, 42), and longer OS to higher contents

TABLE 4 | Classification confusion matrix of correct/incorrect classifications of overall survival in patients bearing gliomas using metabolomic criteria.

Observed overall survival (<i>n</i> = 46)	Predicted overall survival			Percent correct classifications
	Short	Intermediate	Long	
Short (<i>n</i> = 19)	18^a	1	0	94.7
Intermediate (<i>n</i> = 19)	4	15	0	78.9
Long (<i>n</i> = 8)	1	1	6	75.0
All patients (<i>n</i> = 46)				84.7

^aNumbers in bold indicate number and percentages of correct classifications. Growing Methods: CRT, dependent variable OS.

in GPC (35). Additionally, Cho/Cr ratio has been proposed as a biomarker of cellular proliferation and prognosis (22). More recently, a correlation between 2-hydroxyglutarate and the IDH1 mutation (43), suggested that *in vivo* detection of 2-hydroxyglutarate could become a useful prognostic biomarker. However, routinely and regular detection *in vivo* of 2-hydroxyglutarate still remains an important technological challenge in most imaging centers, limiting wider applications. In summary, the present study contributes a larger cohort of patients examined by routinely available *in vitro* MRS, followed during a longer period of time, including also a collection of both Low Grade Gliomas (LGG) and High Grade Gliomas (HGG). Notably, some of the metabolomic biomarkers found valuable here in OS prediction, like MI or GPC (Table 2), are difficult to resolve, or not even detectable *in vivo*. Consequently, our results suggest that postsurgical HR-¹H NMR analysis of extracted tumor biopsies may provide a useful complement to available *in vivo* MRS explorations when addressing OS predictions.

Metabolomic CRT

We implemented a CRT methodology to find, hierarchically, the best classification of OS estimates, using metabolomic criteria. These results complement the earlier decision tree of Li et al. (39), who considered age, MRI features (T₂, T₁, Volume Contrast Enhancement) and *in vivo* spectroscopic biomarkers (Lip+Lac, Cho/Cr, and Cr/NAA), as the main determinants predicting glioblastoma OS.

Our metabolomic CRT grew up to three branches. In the first branch, MI became the most robust biomarker of survival, with larger MI contents revealing longer survivals. Increased MI levels have been reported in inflammatory diseases as Alzheimer (41), renal failure (44), diabetes mellitus (44), and traumatic brain injury (45, 46), suggesting a universal role of this osmolyte in pathophysiological volume regulation. However, MI levels were reported previously to increase (47–49) or decrease (44) with increasing glioma grade *in vivo*. Present results reveal that higher MI levels are associated to longer OS, and lower tumoral grades (Table 3). Since MI occurs primarily in normal astrocytes (44), we hypothesize that the MI resonances detected in the tumor biopsies reveal the healthy astrocyte content within the tumor mass. Larger relative MI contents reveal indirectly relatively

TABLE 5 | Overview of literature correlating OS and MRS biomarkers.

Authors & year	Patients	Glioma grade	Follow-up period ^{a,b}
Li et al. (39)	72	HGG ^c	17.2 m ^a
Reijneveld et al. (40)	14	LGG ^d	30 m (9–40) ^b
Hattingen et al. (41)	45	LGG	37 m (52.1–260.5)
Chang et al. (38)	143	LGG & HGG	n.s.
Yamasaki et al. (33)		HGG	26.1 m (6.5–83.8)
Steffen-Smith et al. (37)	39	HGG	7.1 m (1.6–61.6)
Quon et al. (36)	26	HGG	22.9 m (5–37)
Hattingen et al. (35)	32	HGG (recidives)	8.1 m
Tolia et al. (21)	12	HGG	n.s.
Steidl et al. (34)	37	HGG (recidives)	n.s.
Roldán et al. (20)	28	HGG	3–98 m
Present serie	46	LGG & HGG	14.9 m (0.24–170.4)

^aMedian of the duration of the study in months, ^bParenthesis includes the range of the study in months (m), ^cHGG: High grade glioma, ^dLGG: Low grade glioma, n.s.: not specified.

larger normal astrocyte populations and smaller tumoral cell burdens, supporting consequently longer OS (41, 50, 51).

The second hierarchical branch classifying the lower MI content group, is GPC, with higher GPC levels predicting longer OS. We, and others, have previously reported that relatively higher contributions of GPC and PC are associated to low and high grade gliomas, respectively (16, 52). Interestingly, GPC and PC levels are thought to reflect the balance between phospholipid degradation and phospholipid synthesis, respectively, with increased GPC levels revealing relatively a negative balance between synthesis and degradation, lower tumoral proliferation, and more prolonged survivals.

Gly and Ala provided the third branch of OS discrimination for patient groups with low or high levels of GPC, respectively. High Gly and Ala levels revealed poor prognosis, associated to shorter OS. Indeed, Ala and Gly levels previously reported as hypoxia and redox stress biomarkers (53), revealing tumoral progression to hypoxia, redox stress, and fatal energy failure. They can now be associated to shorter OS predictions.

Limitations

The time span of biopsy collection in this study preceded some of the advances in the characterization of glioma genetics and their influence in malignancy and OS. This circumstance, and the long survival period investigated, precluded the use of genetic biomarkers validated later in the coverage of the present retrospective study. Thus, the correlations between metabolomic and genomic biomarkers of OS in glioma deserve further investigation. Finally, the number of patients involved in the present pilot study is admittedly small but sufficiently robust to support the use of metabolomic biomarkers detected by *in vitro* HR-¹H MRS in OS predictions of postsurgical survival from glioma patients. A multicenter study to extend the number of patients and hospitals involved, is currently being implemented.

CONCLUSION

We used a multivariate CRT to assess postsurgical OS predictions based in the ¹H HR-MRS analysis of the metabolomic profile from neurosurgical biopsies of glioma patients. Present results show that the metabolic profiles of glioma biopsies constitute accurate and independent biomarkers of OS in glioma patients.

DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Ethics Committee of the Hospital La Paz with the approval number PI-2097 with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MG-G collected and integrated retrospective patient data, investigated survival patterns, and wrote the first

draft. SC analyzed HR-¹H NMR spectra. LB provided the univariate and multivariate statistical analyses. PL-L acquired HR-¹H NMR spectra. PF and AP validated demographic, radiological, and histopathological assessments. JR performed many of the neurosurgical procedures providing integrated clinical information, and JS conceived the study and wrote the final draft with all authors commenting.

FUNDING

This work was supported in part by grants PI2017/00361 from Instituto de Investigación Carlos III to JR, grant B2017/BMD-3688 from the Community of Madrid to JR and SC, and grant PI-0143-2016 from the Regional Ministry of Health of the Regional Government of Andalucía to JS.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are grateful to Mr. Javier Pérez CSIC for the professional drafting of the illustrations, to Mrs. María José Guillén CSIC for skillful processing of the biopsies and to Mrs. Teresa Navarro CSIC for granting access to the HR-¹H MRS facility of the Institute of Biomedical Research Alberto Sols.

REFERENCES

- Bush NA, Chang SM, Berger MS. Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurg Rev.* (2017) 40:1–14. doi: 10.1007/s10143-016-0709-8
- Biernat W. 2000 World Health Organization classification of tumors of the nervous system. *Pol J Pathol.* (2000) 51:107–114.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* (2007) 114:97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* (2016) 131:803–20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
- Mittler MA, Walters BC, Stopa EG. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg.* (1996) 85:1091–4. doi: 10.3171/jns.1996.85.6.1091
- Prayson RA, Agamanolis DP, Cohen ML, Estes ML, Kleinschmidt-DeMasters BK, Abdul-Karim F, et al. Interobserver reproducibility among neuropathologists and surgical pathologists in fibrillary astrocytoma grading. *J Neurol Sci.* (2000) 175:33–9. doi: 10.1016/S0022-510X(00)00274-4
- Castillo MS, Davis FG, Surawicz T, Bruner JM, Bigner S, Coons S, et al. Consistency of primary brain tumor diagnoses and codes in cancer surveillance systems. *Neuroepidemiology.* (2004) 23:85–93. doi: 10.1159/000073980
- Cui Y, Tha KK, Terasaka S, Yamaguchi S, Wang J, Kudo K, et al. Prognostic imaging biomarkers in glioblastoma: development and independent validation on the basis of multiregion and quantitative analysis of MR images. *Radiology.* (2016) 278:546–53. doi: 10.1148/radiol.2015150358
- Sanghani P, Ang BT, King NKK, Ren H. Overall survival prediction in glioblastoma multiforme patients from volumetric, shape and texture features using machine learning. *Surg Oncol.* (2018) 27:709–14. doi: 10.1016/j.suronc.2018.09.002
- Henker C, Kriesen T, Glass Á, Schneider B, Piek J. Volumetric quantification of glioblastoma: experiences with different measurement techniques and impact on survival. *J Neurooncol.* (2017) 135:391–402. doi: 10.1007/s11060-017-2587-5
- Cuperlovic-Culf M, Ferguson D, Culf A, Morin P, Touaibia M. 1H NMR metabolomics analysis of glioblastoma subtypes: correlation between metabolomics and gene expression characteristics. *J Biol Chem.* (2012) 287:20164–75. doi: 10.1074/jbc.M111.337196
- Roda JM, Pascual JM, Carceller F, González-Llanos F, Pérez-Higueras A, Solivera J, et al. Nonhistological diagnosis of human cerebral tumors by 1H magnetic resonance spectroscopy and amino acid analysis. *Clin Cancer Res.* (2000) 6:3983–93.
- Opstad KS, Wright AJ, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. Correlations between *in vivo* (1H) MRS and *ex vivo* (1H) HRMAS metabolite measurements in adult human gliomas. *J Magn Reson Imaging.* (2010) 31:289–97. doi: 10.1002/jmri.22039
- García-Martín ML, Hérigault G, Rémy C, Farion R, Ballesteros P, Coles JA, et al. Mapping extracellular pH in rat brain gliomas *in vivo* by 1H magnetic resonance spectroscopic imaging: comparison with maps of metabolites. *Cancer Res.* (2001) 61:6524–31.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* (2009) 324:1029–33. doi: 10.1126/science.1160809
- Righi V, Roda JM, Paz J, Mucci A, Tugnoli V, Rodriguez-Tarduchy G, et al. 1H HR-MAS and genomic analysis of human tumor biopsies discriminate between high and low grade astrocytomas. *NMR Biomed.* (2009) 22:629–37. doi: 10.1002/nbm.1377
- Glunde K, Bhujwala ZM, Ronen SM. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer.* (2011) 11:835–48. doi: 10.1038/nrc3162
- Solivera J, Cerdán S, Pascual JM, Barrios L, Roda JM. Assessment of 31P-NMR analysis of phospholipid profiles for potential differential diagnosis of human cerebral tumors. *NMR Biomed.* (2009) 22:663–74. doi: 10.1002/nbm.1387
- Hattingen E, Raab P, Franz K, Lanfermann H, Setzer M, Gerlach R, et al. Prognostic value of choline and creatine in WHO grade II gliomas. *Neuroradiology.* (2008) 50:759–67. doi: 10.1007/s00234-008-0409-3
- Roldan-Valadez E, Rios C, Motola-Kuba D, Matus-Santos J, Villa AR, Moreno-Jimenez S. Choline-to-N-acetyl aspartate and lipids-lactate-to-creatine ratios

- together with age assemble a significant Cox's proportional-hazards regression model for prediction of survival in high-grade gliomas. *Br J Radiol.* (2016) 89:20150502. doi: 10.1259/bjr.20150502
21. Tolia M, Verganelakis D, Tsoukalas N, Kyrgias G, Papatheasiou M, Mosa E, et al. Prognostic value of MRS metabolites in postoperative irradiated high grade gliomas. *Biomed Res Int.* (2015) 2015:341042. doi: 10.1155/2015/341042
 22. Gao W, Wang X, Li F, Shi W, Li H, Zeng Q. Cho/Cr ratio at MR spectroscopy as a biomarker for cellular proliferation activity and prognosis in glioma: correlation with the expression of minichromosome maintenance protein 2. *Acta Radiol.* (2019) 60:106–12. doi: 10.1177/0284185118770899
 23. Shao W, Gu J, Huang C, Liu D, Huang H, Huang Z, et al. Malignancy-associated metabolic profiling of human glioma cell lines using ¹H NMR spectroscopy. *Mol Cancer.* (2014) 13:197. doi: 10.1186/1476-4598-13-197
 24. Guidoni L, Ricci-Vitiani L, Rosi A, Palma A, Grande S, Luciani AM, et al. ¹H NMR detects different metabolic profiles in glioblastoma stem-like cells. *NMR Biomed.* (2014) 27:129–45. doi: 10.1002/nbm.3044
 25. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* (1993) 3:255–68. doi: 10.1111/j.1750-3639.1993.tb00752.x
 26. Shinoda J, Sakai N, Murase S, Yano H, Matsuhisa T, Funakoshi T. Selection of eligible patients with supratentorial glioblastoma multiforme for gross total resection. *J Neurooncol.* (2001) 52:161–71. doi: 10.1023/A:1010624504311
 27. Matyja E, Grajkowska W, Stępień K, Naganska E. Heterogeneity of histopathological presentation of pilocytic astrocytoma - diagnostic pitfalls. A review. *Folia Neuropathol.* (2016) 54:197–211. doi: 10.5114/fn.2016.62530
 28. Collins VP, Jones DT, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* (2015) 129:775–88. doi: 10.1007/s00401-015-1410-7
 29. Cerdán S, Parrilla R, Santoro J, Rico M. ¹H NMR detection of cerebral myo-inositol. *FEBS Lett.* (1985) 187:167–72. doi: 10.1016/0014-5793(85)81235-7
 30. Klunk WE, Xu CJ, Panchalingam K, McClure RJ, Pettegrew JW. Analysis of magnetic resonance spectra by mole percent: comparison to absolute units. *Neurobiol Aging.* (1994) 15:133–40. doi: 10.1016/0197-4580(94)90153-8
 31. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed.* (2000) 13:129–53. doi: 10.1002/1099-1492(200005)13:3<129::AID-NBM619>3.0.CO;2-V
 32. Breiman L. *Classification and Regression Trees*. Belmont, CA: Wadsworth International Group (1984).
 33. Yamasaki F, Kurisu K, Kajiwara Y, Watanabe Y, Takayasu T, Akiyama Y, et al. Magnetic resonance spectroscopic detection of lactate is predictive of a poor prognosis in patients with diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro Oncol.* (2011) 13:791–801. doi: 10.1093/neuonc/nor038
 34. Steidl E, Pilatus U, Hattingen E, Steinbach JP, Zanella F, Ronellenfitsch MW, et al. Myo-inositol as a biomarker in recurrent glioblastoma treated with bevacizumab: A ¹H-magnetic resonance spectroscopy study. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0168113. doi: 10.1371/journal.pone.0168113
 35. Hattingen E, Bähr O, Rieger J, Blasel S, Steinbach J, Pilatus U. Phospholipid metabolites in recurrent glioblastoma: *in vivo* markers detect different tumor phenotypes before and under antiangiogenic therapy. *PLoS ONE.* (2013) 8:e56439. doi: 10.1371/journal.pone.0056439
 36. Quon H, Brunet B, Alexander A, Murtha A, Abdulkarim B, Fulton D, et al. Changes in serial magnetic resonance spectroscopy predict outcome in high-grade glioma during and after postoperative radiotherapy. *Anticancer Res.* (2011) 31:3559–65.
 37. Steffen-Smith EA, Shih JH, Hipp SJ, Bent R, Warren KE. Proton magnetic resonance spectroscopy predicts survival in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *J Neurooncol.* (2011) 105:365–73. doi: 10.1007/s11060-011-0601-x
 38. Chang SM, Nelson S, Vandenberg S, Cha S, Prados M, Butowski N, et al. Integration of preoperative anatomic and metabolic physiologic imaging of newly diagnosed glioma. *J Neurooncol.* (2009) 92:401–15. doi: 10.1007/s11060-009-9845-0
 39. Li X, Jin H, Lu Y, Oh J, Chang S, Nelson SJ. Identification of MRI and ¹H MRS parameters that may predict survival for patients with malignant gliomas. *NMR Biomed.* (2004) 17:10–20. doi: 10.1002/nbm.858
 40. Reijneveld JC, van der Grond J, Ramos LM, Bromberg JE, Taphoorn MJ. Proton MRS imaging in the follow-up of patients with suspected low-grade gliomas. *Neuroradiology.* (2005) 47:887–91. doi: 10.1007/s00234-005-1435-z
 41. Hattingen E, Raab P, Franz K, Zanella FE, Lanfermann H, Pilatus U. Myo-inositol: a marker of reactive astrogliosis in glial tumors? *NMR Biomed.* (2008) 21:233–41. doi: 10.1002/nbm.1186
 42. Jaskólski DJ, Fortuniak J, Majos A, Gajewicz W, Papierz W, Liberski PP, et al. Magnetic resonance spectroscopy in intracranial tumours of glial origin. *Neurol Neurochir Pol.* (2013) 47:438–49. doi: 10.5114/ninp.2013.32999
 43. Leather T, Jenkinson MD, Das K, Poptani H. Magnetic resonance spectroscopy for detection of 2-hydroxyglutarate as a biomarker for IDH mutation in gliomas. *Metabolites.* (2017) 7:E29. doi: 10.3390/metabo7020029
 44. Castillo M, Smith JK, Kwok L. Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas. *AJNR Am J Neuroradiol.* (2000) 21:1645–9.
 45. Pascual JM, Solivera J, Prieto R, Barrios L, López-Larrubia P, Cerdán S, et al. Time course of early metabolic changes following diffuse traumatic brain injury in rats as detected by (¹H) NMR spectroscopy. *J Neurotrauma.* (2007) 24:944–59. doi: 10.1089/neu.2006.0190
 46. Croall I, Smith FE, Blamire AM. Magnetic resonance spectroscopy for traumatic brain injury. *Top Magn Reson Imaging.* (2015) 24:267–74. doi: 10.1097/RMR.000000000000063
 47. Kim JH, Chang KH, Na DG, Song IC, Kwon BJ, Han MH, et al. ³T ¹H-MR spectroscopy in grading of cerebral gliomas: comparison of short and intermediate echo time sequences. *AJNR Am J Neuroradiol.* (2006) 27:1412–8.
 48. Natsumeda M, Igarashi H, Nomura T, Ogura R, Tsukamoto Y, Kobayashi T, et al. Accumulation of 2-hydroxyglutarate in gliomas correlates with survival: a study by 3.0-tesla magnetic resonance spectroscopy. *Acta Neuropathol Commun.* (2014) 2:158. doi: 10.1186/s40478-014-0158-y
 49. Fan G, Sun B, Wu Z, Guo Q, Guo Y. *In vivo* single-voxel proton MR spectroscopy in the differentiation of high-grade gliomas and solitary metastases. *Clin Radiol.* (2004) 59:77–85. doi: 10.1016/j.crad.2003.08.006
 50. Galanaud D, Nicoli F, Chinot O, Confort-Gouny S, Figarella-Branger D, Roche P, et al. Noninvasive diagnostic assessment of brain tumors using combined *in vivo* MR imaging and spectroscopy. *Magn Reson Med.* (2006) 55:1236–45. doi: 10.1002/mrm.20886
 51. Opstad KS, Ladroue C, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. Linear discriminant analysis of brain tumour (¹H) MR spectra: a comparison of classification using whole spectra versus metabolite quantification. *NMR Biomed.* (2007) 20:763–70. doi: 10.1002/nbm.1147
 52. Sabatier J, Gilard V, Malet-Martino M, Ranjeva JP, Terral C, Breil S, et al. Characterization of choline compounds with *in vitro* ¹H magnetic resonance spectroscopy for the discrimination of primary brain tumors. *Invest Radiol.* (1999) 34:230–5. doi: 10.1097/00004424-199903000-00013
 53. Tsun ZY, Possemato R. Amino acid management in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* (2015) 43:22–32. doi: 10.1016/j.semdev.2015.08.002

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Gandía-González, Cerdán, Barrios, López-Larrubia, Feijóo, Palpan, Roda and Solivera. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Assessment of Pre-operative Measurements of Tumor Size by MRI Methods as Survival Predictors in Wild Type IDH Glioblastoma

Alexis Palpan Flores^{1*}, Catalina Vivancos Sanchez¹, José M. Roda¹, Sebastian Cerdán², Andres Javier Barrios³, Cristina Utrilla³, Aranzazu Royo³ and Maria Luisa Gandía González^{1*}

¹ Department of Neurosurgery, University Hospital La Paz, Madrid, Spain, ² Institute of Biomedical Research "Alberto Sols" CSIC/UAM, Madrid, Spain, ³ Department of Neuroradiology, University Hospital La Paz, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Herui Wang,
National Cancer Institute (NCI),
United States

Reviewed by:

Alireza Mansouri,
Pennsylvania State University (PSU),
United States
Dusten Unruh,
Northwestern Medicine, United States

*Correspondence:

Alexis Palpan Flores
alexispalpan@hotmail.com
Maria Luisa Gandía González
marisagg4@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuro-Oncology and Neurosurgical
Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 16 May 2020

Accepted: 28 July 2020

Published: 02 September 2020

Citation:

Palpan Flores A, Vivancos Sanchez C, Roda JM, Cerdán S, Barrios AJ, Utrilla C, Royo A and Gandía González ML (2020) Assessment of Pre-operative Measurements of Tumor Size by MRI Methods as Survival Predictors in Wild Type IDH Glioblastoma. *Front. Oncol.* 10:1662. doi: 10.3389/fonc.2020.01662

Objective: We evaluate the performance of three MRI methods to determine non-invasively tumor size, as overall survival (OS) and Progression Free Survival (PFS) predictors, in a cohort of wild type, IDH negative, glioblastoma patients. Investigated protocols included bidimensional (2D) diameter measurements, and three-dimensional (3D) estimations by the ellipsoid or semi-automatic segmentation methods.

Methods: We investigated OS in a cohort of 44 patients diagnosed with wild type IDH glioblastoma (58.2 ± 11.4 years, 1.9/1 male/female) treated with neurosurgical resection followed by adjuvant chemo and radiotherapy. Pre-operative MRI images were evaluated to determine tumor mass area and volume, gadolinium enhancement volume, necrosis volume, and FLAIR-T₂ hyper-intensity area and volume. We implemented then multivariate Cox statistical analysis to select optimal predictors for OS and PFS.

Results: Median OS was 16 months (1–42 months), ranging from 9 ± 2.4 months in patients over 65 years, to 18 ± 1.6 months in younger ones. Patients with tumors carrying O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferase (MGMT) methylation survived 30 ± 5.2 vs. 13 ± 2.5 months in non-methylated. Our study evidenced high and positive correlations among the results of the three methods to determine tumor size. FLAIR-T₂ hyper-intensity areas (2D) and volumes (3D) were also similar as determined by the three methods. Cox proportional hazards analysis with the 2D and 3D methods indicated that OS was associated to age ≥ 65 years (HR 2.70, 2.94, and 3.16), MGMT methylation (HR 2.98, 3.07, and 2.90), and FLAIR-T₂ $\geq 2,000$ mm² or ≥ 60 cm³ (HR 4.16, 3.93, and 3.72), respectively. Other variables including necrosis, tumor mass, necrosis/tumor ratio, and FLAIR/tumor ratio were not significantly correlated with OS.

Conclusion: Our results reveal a high correlation among measurements of tumor size performed with the three methods. Pre-operative FLAIR-T₂ hyperintensity area and volumes provided, independently of the measurement method, the optimal neuroimaging features predicting OS in primary glioblastoma patients, followed by age ≥ 65 years and MGMT methylation.

Keywords: glioblastoma, overall survival, progression free survival, IDH mutation, tumor volumetry, linear method, semi-automatic segmentation method, ellipsoid method

INTRODUCTION

Glioblastomas are the most aggressive and frequent primary tumors of the central nervous system in adult populations, with an approximate incidence of 3–5/100,000 people (1, 2). Overall Survival (OS) predictions around 12–18 months are normally expected, remaining poor despite surgical, and adjuvant chemo- and radio-therapy treatments (3, 4). Glioblastomas are currently classified in primary or secondary subtypes, reflecting either a “*de novo*” origin without evidence of any preceding lesion or, a “progression from a lower grade astrocytoma,” respectively (5). Both subtypes have very different OS profiles, with longer survival estimates for the secondary. The molecular signature discriminating between primary (IDH wild type), or secondary subtypes, is the absence or presence, of the isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation (5–7), respectively. Methylation of the O6 methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) promoter represents the next molecular feature in prognostic relevance, predicting a better response to alkylating agents like temozolamide (TMZ), during adjuvant chemotherapy (8, 9).

Both, clinical and neuroimaging variables, have been repeatedly recommended as prognostic factors (10, 11). More specifically, non-invasive measurements of the tumor size have played a controversial role in OS and Progression Free Survival (PFS) predictions of glioblastoma patients (12–19). Briefly, Magnetic Resonance Imaging (MRI) measurements of two-dimensional (2D) diameters of the tumor through the imaging plane were recommended initially by Macdonald et al. (20), and later incorporated by the Response Assessment Neuro-Oncology (RANO) working group (21), as criteria of response to therapy. However, the efficacy of the 2D protocol remains currently under debate, particularly, in morphologically irregular tumors (22–24). Almost in parallel, the 3D ellipsoid method, calculating the tumor volume (25, 26) and using three orthogonal diameters, was implemented for different tumors, including glioblastoma. However, the irregular shape of most tumors continued to limit accurate volume determinations using this approach (24, 27). More recently, advanced 3D image-processing software packages using semi-automatic segmentation algorithms have become available, providing more accurate estimations of tumor volumes, with the ability to measure irregular tumor shapes and their compartments (22, 28). Nevertheless, a main question arises on whether this increased accuracy in the volume measurement results in any benefit in terms of prognosis, as compared to the other two, simpler to implement, methods (23).

Notably, OS and PFS in glioblastomas have been previously associated to various compartmental tumor volumes including: the volume of necrosis (12–14), the volume of contrast-enhancing tumor (11), the volume of FLAIR-T₂ hyperintensity (13–18), or the tumor/necrosis volume ratio (13, 19).

Abbreviations: CI, Confidence Interval; d, days; EOR, Extent of resection; ET, Enhancing tumor; FLAIR, Fluid-attenuation inversion recovery; FTR, FLAIR-T₂/Tumor mass ratio; HR, Hazard ratio (Cox method); IDH, Isocitrate dehydrogenase; m, months; MGMT, O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase; MRI, Magnetic resonance imaging; NTR, Necrosis/Tumor mass ratio; PFS, Progression-free survival; ROI, region of interest; RTV, Residual tumor volume; TM, Tumor mass; TMZ, Temozolamide; TN, Tumoral necrosis; y, years.

Unfortunately, results and conclusions from many of these studies remain contradictory. Discrepancies may originate, at least partially, from the diversity of volumetric techniques implemented and, in some cases, from incomplete morphological or molecular characterizations of the tumors investigated. Together, these limitations result in a plethora of uncertainties, preventing more accurate predictions (6, 13). On these grounds, assessment of the influence of the different methods of pre-surgical tumor volume determination, their relationship with the underlying clinical and genetic biomarkers, or even with the efficacy of the neurosurgical resections, entail vital relevance to improve the accuracy of current OS and PFS predictions.

On these grounds, we aimed here to assess the influence of different methods of determination of the tumor size, tumor compartments, genetic profile, and some relevant clinical and neurosurgical variables, in the prediction of OS and PFS in primary glioblastomas. To this end, we investigated OS and PFS in a consecutive cohort of patients with primary IDH wild-type glioblastomas, selected as candidates for neurosurgical resection, followed by adjuvant chemo- and radiotherapy. Then, we compared measurements of the tumoral size and its compartments by the 2D diameter, the 3D ellipsoid, and the 3D semi-automatic (Smartbrush[®] software by Brainlab AG) methods, and correlated them with OS and PFS, considering also the profile of IDH and MGMT mutations, clinical variables as anatomical location or eloquence, and the extension of resection. We found high correlations among measurements of tumoral size by the three methods, with pre-operative FLAIR-T₂ hyperintensity areas and volumes providing the optimal neuroimaging biomarker to predict OS in primary glioblastoma patients, together with age \geq 65 years and MGMT methylation.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

Our study was conducted in the period 2015–2019, with the consecutive inclusion of adult patients with newly diagnosed IDH wild-type glioblastomas (Grade IV WHO), treated in the Neurosurgery Department of the University Hospital La Paz, Madrid, Spain (<https://www.comunidad.madrid/hospital/lapaz/>). The protocol was approved by the institutional ethics committee, followed the rules of the Helsinki Declaration, and complied with the STROBE checklist (29).

All consecutive adult patients with suspected high-grade glioma, candidates for surgical resection were initially included. Thereafter, 44 patients were selected, with a definitive diagnosis of glioblastoma in the absence of IDH mutation. Inclusion criteria were:

- i) Pre-operative MRI, at least 72 h after treatment with dexamethasone (4 mg, every 8 h),
- ii) Post-operative MRI, between 24 and 48 h after surgery, to assess the presence of tumor in contrast enhancement tissue (30, 31) and,
- iii) Radiotherapy (2.0 grays Gy/day, 60 Gy total) and TMZ (75 mg/m² oral daily) according to Stupp (32), followed by adjuvant TMZ (150–200 mg/m² oral for 5 days during

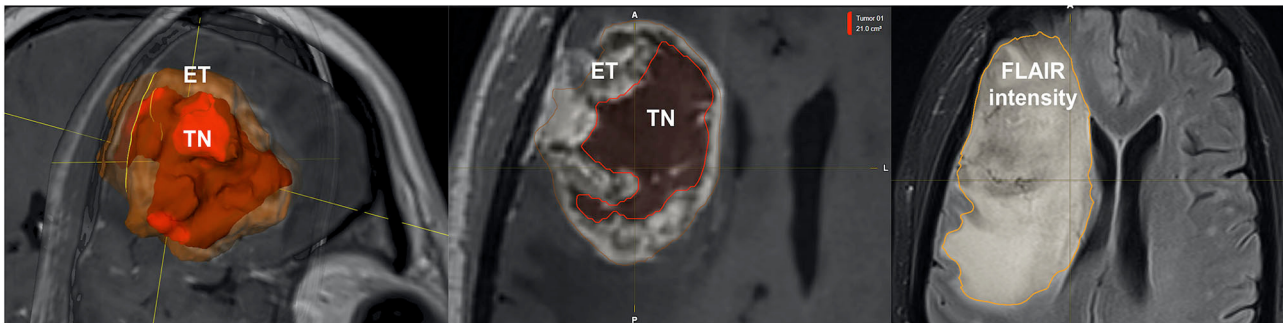


FIGURE 1 | Representative volumetric parameters calculated by the semi-automatic method. Similar compartments were measured by the 2D and, 3D ellipsoid methods. Left: Enhancing tumor (ET), Center: Tumor necrosis (TN), Right: Fluid-attenuation inversion recovery (FLAIR intensity).

each 28-day cycle) with 6–12 cycles depending on the therapeutic response.

The exclusion criteria were patients who could not be offered the standard treatment (resective surgery followed by chemoradiotherapy) because of very high surgical risk, or also those who refused surgical or chemo- and/or-radiotherapy treatments.

MRI

Magnetic Resonance Imaging (MRI) was performed pre-operatively in a 3 Tesla magnet, (MAGNETOM Skyra, Siemens, Erlangen/Germany) and postoperatively at 1.5 Tesla (MAGNETOM Avanto, Siemens, Erlangen/Germany).

Pre-operative MRI included: Sagittal 3D- T_{1w} -SPACE (TR: 650 ms, TE: 11 ms, and 1 mm isotropic resolution) before and after gadolinium (Dotarem[®] 0.2 mL/kg IV bolus infused at rate of 2 mL/s) administration, Axial and Coronal 2D- T_{2w} -FSE (TR = 4,450 ms, TE: 83 ms, and slice thickness: 4 mm), Axial 2D Fluid-Attenuation Inversion Recovery (FLAIR) (TR = 12,000 ms, TE: 101 ms, and TI: 2,760).

Post-operative MRI included: Sagittal 3D- T_{1w} -SPACE (TR: 600 ms, TE: 8 ms, and 1 mm isotropic resolution), Axial and Coronal 2D- T_{2w} -FSE (TR: 4,000 ms, TE: 81 ms, and slice thickness: 5 mm), Axial 2D FLAIR (TR = 9,000 ms, TE: 92 ms, and TI: 2,500). Sagittal 3D- T_{1w} -SPACE with contrast (TR: 450 ms, TE: 11 ms, and 1 mm isotropic resolution).

Tumor Size Analysis

Quantitative measurements were performed by two neurosurgeons who jointly carried out the determinations. Representative pre-operative MRI measurements of tumor size measurements are illustrated in **Figure 1**, implementing either;

- i) 2D diameters method: as the sum of the products of perpendicular diameters of all contrast-enhancing lesions in T_1 , as recommended by RANO (23) (**Figure 2**),
- ii) Orthogonal ellipsoid method: as the product of the longest perpendicular diameters in axial (a), sagittal (b), and coronal (c) sections divided by two ($a \times b \times c/2$), preferred to the formula $4/3 \pi (a/2 \times b/2 \times c/2)$ for its easier and more reliable implementation (27, 33) (**Figure 3**); and

- iii) Manually selecting the region of interest (ROI) using the Smartbrush tool of semi-automatic segmentation software (BrainLAB[®], Munich Germany; **Figure 4**).

The following volumetric compartments, their definitions, and ratios were chosen, to be able to correlate with the OS estimates in previous studies (11–19):

- a) Enhancing tumor (ET) in the T_1 sequence: As the tumor enhancement after gadolinium injection.
- b) Tumoral necrosis (TN): as the region of enhancing tumor which does not show enhancement after gadolinium administration. Non-necrotic cystic lesions were excluded.
- c) Tumor mass (TM): Sum of the enhancing tumor and necrosis.
- d) Hyperintensity in FLAIR- T_2 : as the region of hyper-intensity in FLAIR- T_2 including the tumor mass and peritumoral area, including vasogenic edema and tumor infiltration.
- e) Residual tumor volume (RTV): Volume of enhancement that results from the post-contrast and pre-contrast subtraction in the T_1 sequence, reflecting the residual “enhancing tumor.”
- f) Extent of resection (EOR): as the result of: [(initial enhancing tumor) – (the remaining enhancing tumor after resection)]/(initial enhancing tumor) expressed as a percentage.
- g) Necrosis/Tumor mass ratio (NTR).
- h) FLAIR- T_2 /Tumor mass ratio (FTR).

Immunohistochemistry and Genetic Assessment

Anatomopathological analysis of biopsies obtained during neurosurgery included the immunohistochemical detection of the IDH (isocitrate dehydrogenase R132H) mutation. In negative cases, with high suspicion of IDH mutation no-R132H, a genetic study was performed by pyrosequencing (34). All cases underwent analysis of the methylation status of the O^6 methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter using the MethyLigh PCR reaction (35).

Statistics

Univariate statistical analyses included analysis of means, median and standard deviation. Bivariate analysis were

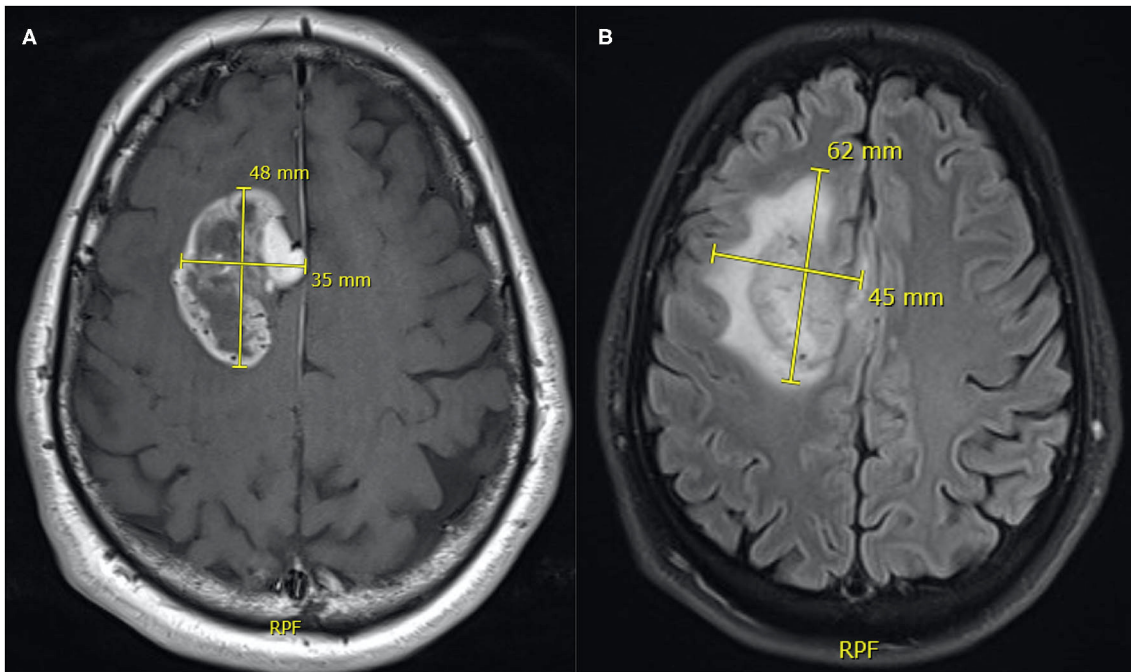


FIGURE 2 | Representative measurements of tumor size **(A)** and FLAIR-T₂ **(B)** area by the 2D orthogonal diameters method. The area of the tumor mass is the product of 48 × 35 mm = 1,680 mm² and the FLAIR-T₂ area is 62 × 45 mm = 2,790 mm².

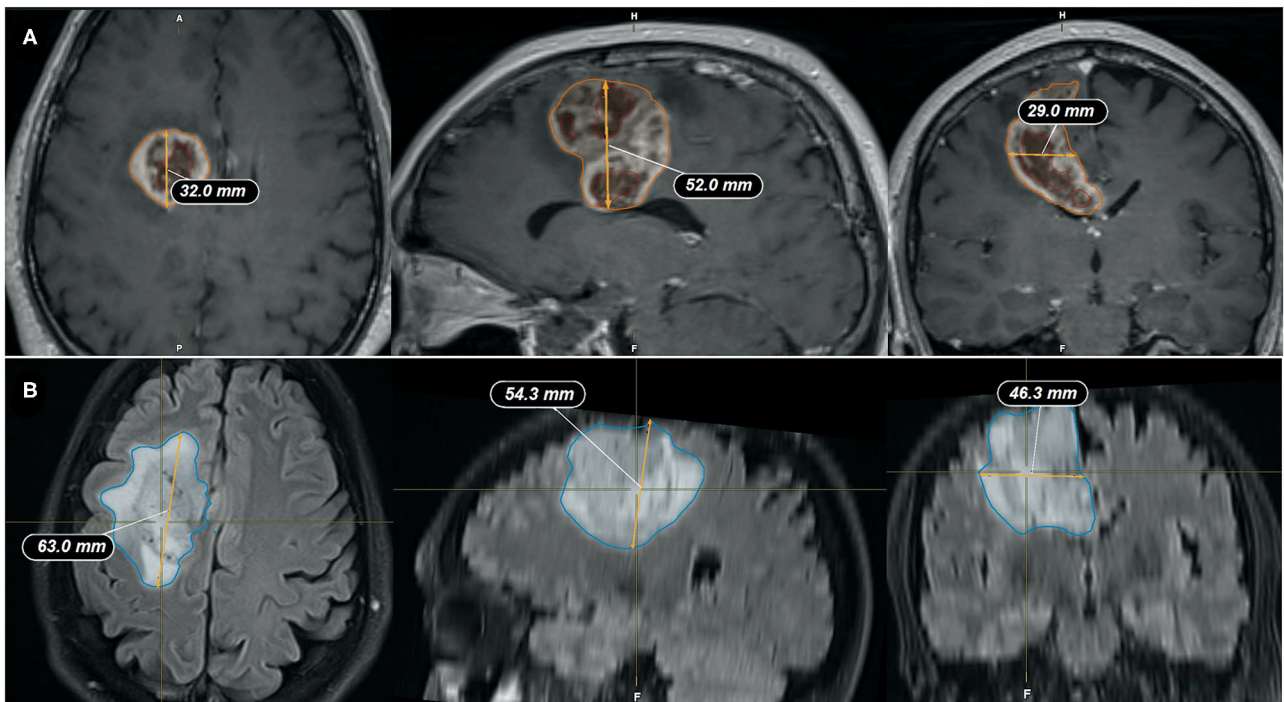


FIGURE 3 | Representative measurements of the tumor size by the ellipsoid method. **(A)** Tumor mass volume is: $(32 \times 52 \times 29\text{ mm})/2 = 24.13 \text{ cm}^3$; **(B)** FLAIR-T₂ volume is: $(63 \times 54.3 \times 46.3\text{ mm})/2 = 79.19 \text{ cm}^3$. Coronal (left), Sagittal (center), and Axial (right) slices through the tumor.

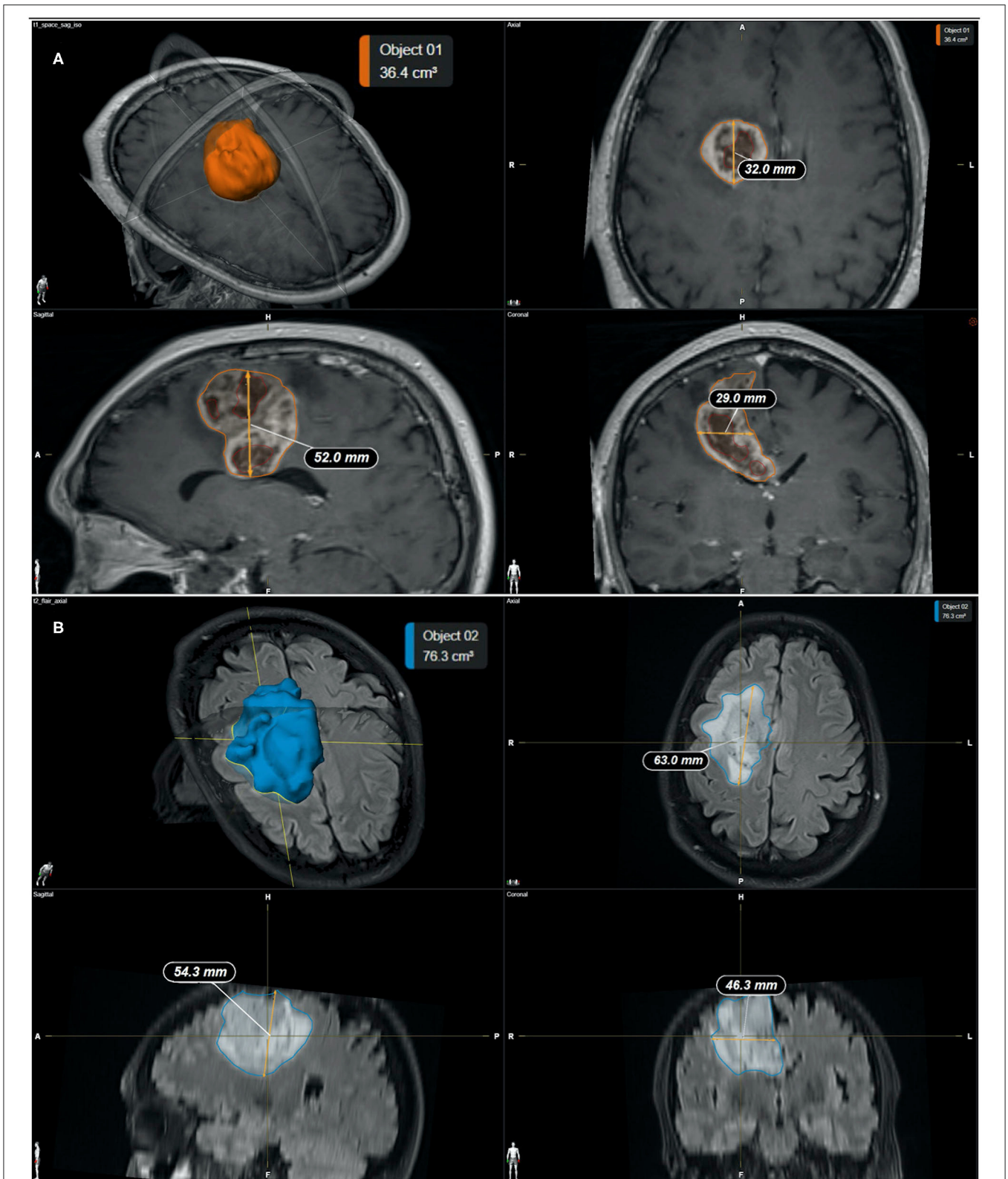


FIGURE 4 | (A) Representative measurements of the tumor mass by the semi-automatic method (SmartBrush software—BrainLAB®). **(A)** Calculated tumor mass volume is 36.4 cm³; **(B)** Calculated FLAIR-T₂ volume is 76.3 cm³. Individual panels indicate; 3D reconstruction (top left), Coronal (top right), Sagittal (bottom left), and Axial (bottom right) slices through the tumor, respectively.

TABLE 1 | Clinical, genetic, neurosurgical, and chemotherapy variables of the patient cohort and associated overall survival, and progression free survivals.

Parameter		n = 44
Age	Mean (years) ± SD (range)	58.2 ± 11.4 (35–81)
Gender	Male	29 (65.9%)
	Female	15 (34.1%)
Comorbidity ^a		26 (59.1%)
Karnofsky Scale	Median (range)	90 (70–100)
Hemisphere	Right	26 (59.1%)
	Left	18 (40.9%)
Eloquency ^b	Not eloquent ratio	10/44 (22.7%)
	Near-eloquent ratio	30/44 (68.2%)
	Eloquent ratio	4/44 (9.1%)
Location	Frontal	13 (29.5%)
	Temporal	11 (25%)
	Parietal	11 (25%)
	Occipital	9 (20.5%)
	Deep	0 (0%)
	Multicentric	4 (9.1%)
MGMT status	Methylated	17 (38.6%)
	Non-methylated	27 (61.4%)
IDH wild-type		100%
Extent of Resection	%, Median (Q1–Q3)	95.9 (89.03–100)
Stupp protocol ^c		100%
Chemotherapy with TMZ	Median of cycles (Q1–Q3)	6 (3–12)
Second line of chemotherapy ^d		10 (22.7%)
Progression free survival	Median (months), 95% CI	7 (5–9)
Overall survival	Median (months), 95% CI	16 (11–19)

^aArterial hypertension, diabetes mellitus, and/or pulmonary, renal, cardiac, oncologic, or any severe disease; ^bEloquency according to Sawaya et al. (36); TMZ, Temozolamide; MGMT, O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase; ^cStupp protocol, Radiotherapy (2.0 Gy/day; total dose, 60 Gy), and temozolamide (75 mg/m² orally daily) (32); ^dLomustine or Fotemustine; Q1–Q3 first and third quartiles (interquartile range); CI, confidence interval.

performed according of the type of variable; Pearson and Spearman's correlation coefficient to compare among volumetric and diameter measurements by three methods, Mann–Whitney *U*-test for volumes according to the state of MGMT methylation, with log-rank test used for time-event analyzes and survival analysis using the Kaplan–Meier method. Finally, the multivariate analysis was performed using Cox regression test to assess the independence of possible prognostic factors in overall and progression free survival for the three measurement techniques. The analysis was conducted using Microsoft Excel 2016 and the statistical package Stata version 14 (StataCorp LLC, Texas, USA) as implemented in a personal PC operating under the MacOS environment.

RESULTS

Table 1 summarizes the patient cohort and tumor characteristics of our study. A total of 44 patients met the inclusion criteria. Mean age was 58.15 ± 11.36 (range 35–81 years), with a

TABLE 2 | Tumor and compartment volumes as calculated by 2D diameter, ellipsoid, and semi-automatic segmentation methods.

Method	Compartment	Value (units)
2D diameter	Area of the tumor mass ^a	1,203 ± 911 (80–3,720) mm ²
	Area of hyperintensity in FLAIR-T ₂	3,210 ± 1,422 (780–5,795) mm ²
	FLAIR-T ₂ /tumor ratio ^c	2.91 ± 3.48 (1.2–17.9)
3D Ellipsoid	Tumoral mass	24.9 ± 23.1 (0.4–96.7) cm ³
	FLAIR-T ₂ volume	89.7 ± 51.2 (8.9–191) cm ³
	FLAIR-T ₂ /tumor ratio ^c	4.14 (2.6–7.15)
3D semi-automatic	Enhancing tumor ^b (T1+Gd)	14.2 ± 12.2 (0.8–47) cm ³
	Necrosis ^b	15.6 ± 18.3 (0–73) cm ³
	Tumoral mass	29.8 ± 26.9 (1.1–120) cm ³
	FLAIR-T ₂ volume	95.7 ± 55.2 (6.7–202) cm ³
	FLAIR-T ₂ /tumor ratio ^c	3.39 (2.32–5.5)
	Necrosis/tumor ratio ^{b,c}	0.44 (0.26–0.59)

Results are expressed as mean ± SD with range of measured values in parenthesis.

^aNecrosis + enhancing tumor in T1+Gd.

^bOnly measurable by Semi-automatic method.

^cQ1 and Q3 indicate the first and third quartiles.

male/female ratio of 1.9/1, reflecting masculine predominance (2). The median of Karnofsky index (37) was 90 (range 70–100) with the frontal location most frequently found 13/44 (29.5%) and the right/left distribution of 0.7/1. The percentage tumors in eloquent and near-eloquent areas (36) were 9.1 and 68.2%, respectively. Most frequent clinical presentations included; headache (40%), cognitive deficit (31.1%), and motor deficit (26.7%). All patients were IDH negative and the percentage of the methylation of the MGMT promoter was 38.6%. Six cycles of chemotherapy each 28 days with TMZ was completed in 63.6% of patients. Re-operation was performed in 15.6% of them. A second line of chemotherapy was administered in 28.9%, with Fotemustine[®] (22.7%) and Lomustine[®] (6.8%) as the most used drugs. Median percentage of tumor resection was 95.9% (range 62.3–100%).

Tumor Size and Compartmental Correlation Analysis: Diameters, Ellipsoid, and Semi-automatic Methods

Table 2 summarizes measurements of different tumor compartmental areas and volumes with the three methods investigated, while **Figure 5** provides the correlations within them. Most of the compartmental volumes determined by the 3D ellipsoid and automatic segmentation methods were similar, revealing consistency. Similarly, using the sum of the products of major perpendicular diameters, the mean of tumor area had a high correlation with the tumor mass volume

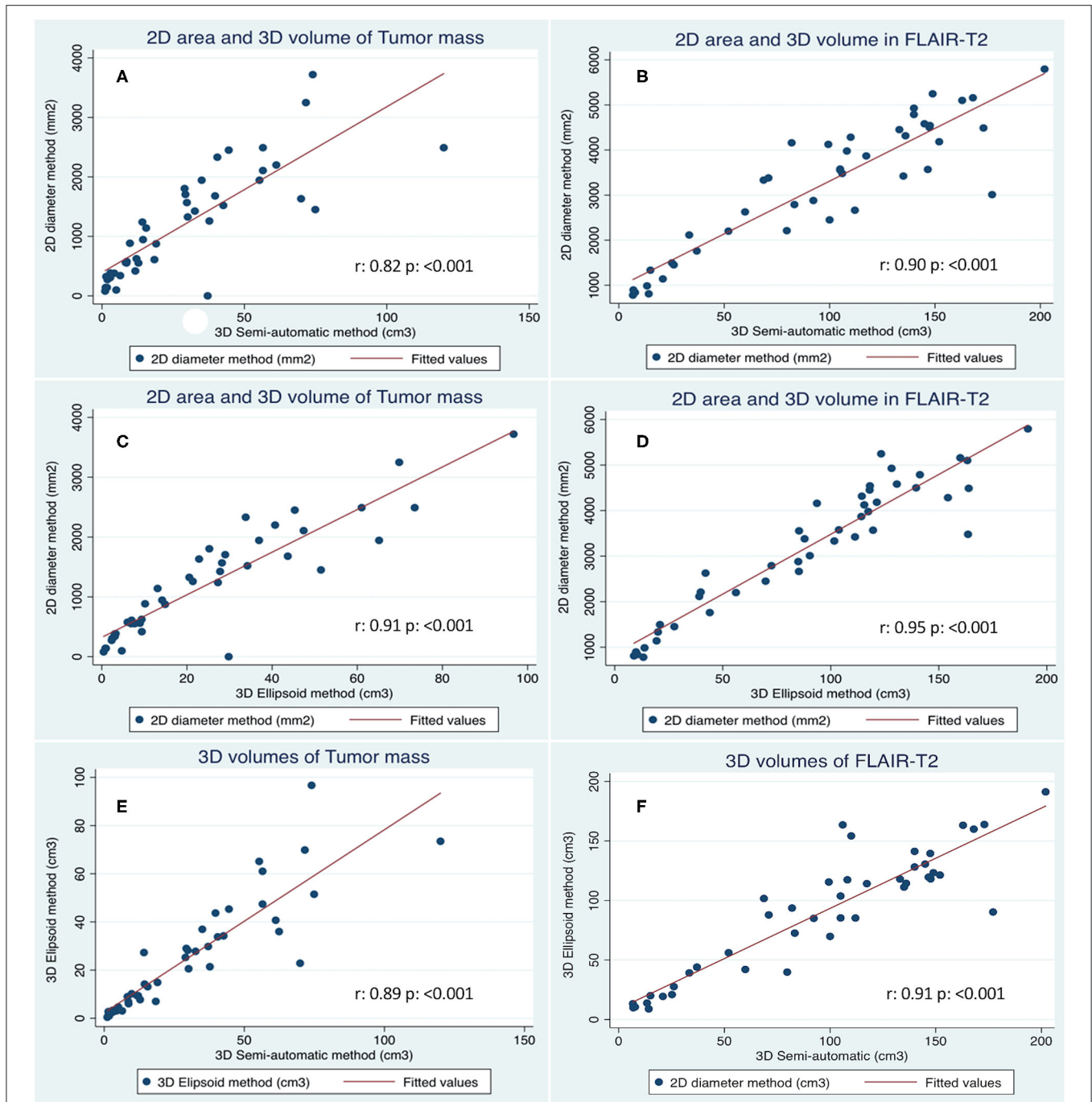


FIGURE 5 | Correlation of tumor size measurements as performed with the three methods. **(A)** Tumor mass calculated with the 2D diameter vs. 3D Semi-automatic methods. **(B)** FLAIR-T₂ area and volume calculated with 2D diameter vs. 3D semi-automatic methods. **(C)** Tumor mass calculated with the 2D diameter vs. 3D Ellipsoid method. **(D)** FLAIR-T₂ area and volume calculated with 2D diameter vs. 3D Ellipsoid method. **(E)** Tumor mass calculated with the 3D Ellipsoid vs. 3D Semi-automatic method. **(F)** FLAIR-T₂ volumes calculated with 3D Ellipsoid vs. 3D Semi-automatic methods.

measured by the ellipsoid ($r = 0.91, p < 0.001$), and semi-automatic segmentation ($r = 0.82, p < 0.001$) methods. The mean FLAIR-T₂ area also highly correlated with the FLAIR-T₂ volume by the ellipsoid method ($r = 0.95, p < 0.001$), and the semi-automatic segmentation ($r = 0.90, p < 0.001$) methods

(Figure 5). The mean of the enhancing tumor and of the necrosis volumes were only assessed by the semi-automatic segmentation method, since the irregular morphology hampered the use of the 2D diameter method and the ellipsoid formula.

We found a high correlation between the means of the tumor mass volume (Figure 5E, $r = 0.89, p < 0.001$) and between the means of the FLAIR-T₂ volumes (Figure 5F, $r = 0.91, p < 0.001$) by both methods. The correlation between

the means of the FLAIR-T₂/tumor ratio were not as high as the primary measurements, between the 2D diameter and the ellipsoid method was ($r = 0.69, p < 0.001$), between ellipsoid and semi-automatic methods was ($r = 0.84, p < 0.001$) and

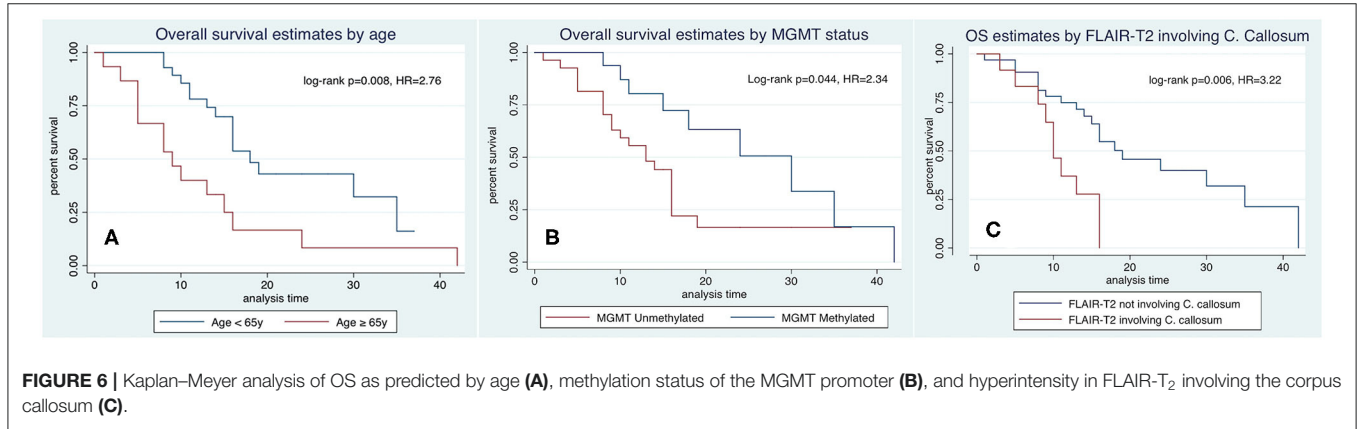


FIGURE 6 | Kaplan–Meyer analysis of OS as predicted by age (A), methylation status of the MGMT promoter (B), and hyperintensity in FLAIR-T₂ involving the corpus callosum (C).

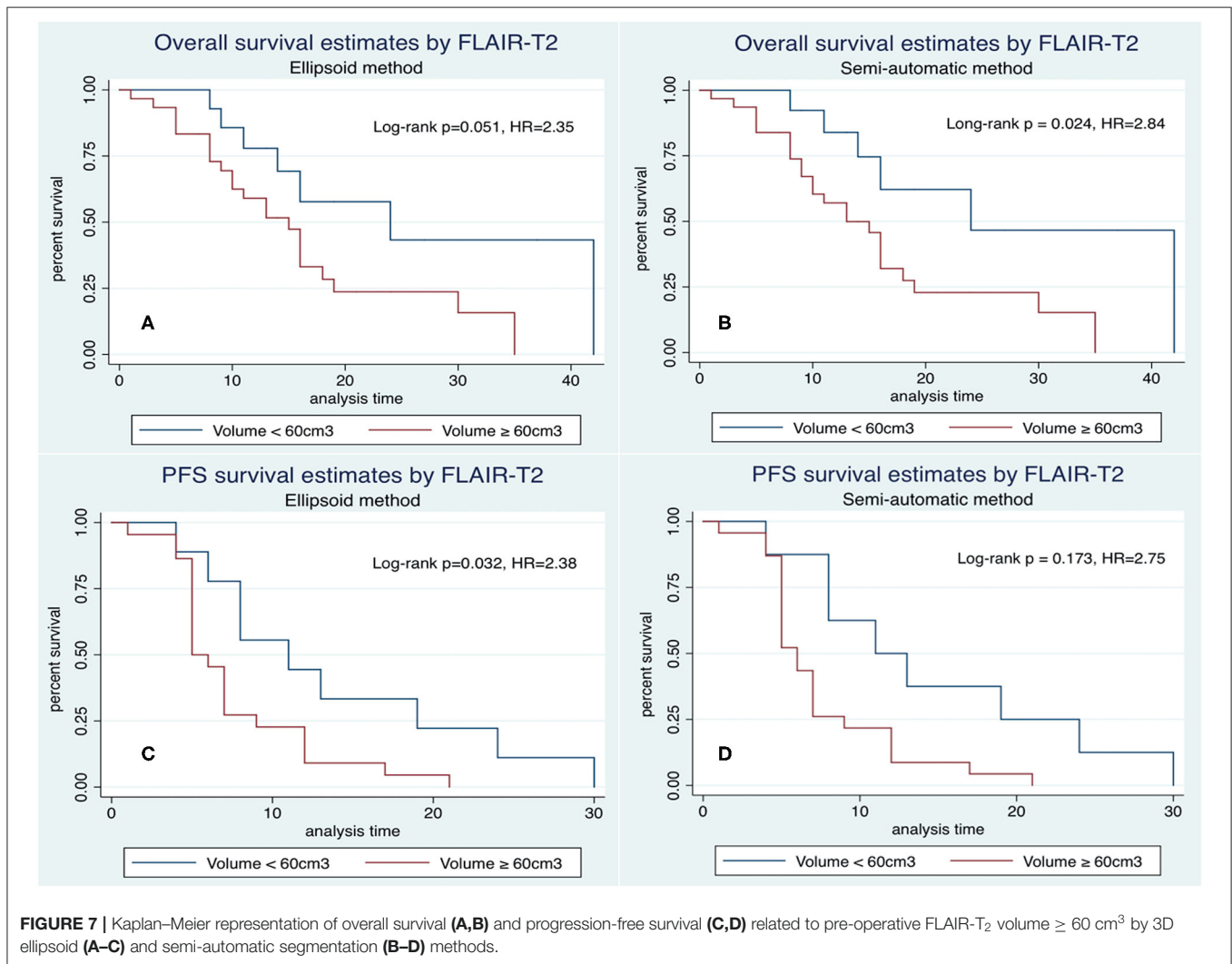


FIGURE 7 | Kaplan–Meyer representation of overall survival (A,B) and progression-free survival (C,D) related to pre-operative FLAIR-T₂ volume ≥ 60 cm³ by 3D ellipsoid (A–C) and semi-automatic segmentation (B–D) methods.

between 2D diameter and semi-automatic method was ($r = 0.56$, $p < 0.001$). The necrosis/tumor ratio could only be obtained by the semi-automatic method and therefore could not be correlated with other methods.

Survival Analysis

Figure 6 illustrates Kaplan–Meier profiles of OS depending on the age of the patients and methylation status of the tumors. Median OS of the investigated cohort was 16 ± 9.1 months (range 1–42 months). Gender, Karnofsky status, location of the tumor, eloquence and extent of tumor resection, had no impact on OS, although tumors with a extent of resection higher than 98% showed a tendency to greater survival, almost reaching statistical significance (18 ± 2.6 vs. 14 ± 4.2 months, $p = 0.497$). The following features merit further comments.

Age. Elderly were associated with a higher mortality in the bivariate analysis, being 18 ± 1.6 months in patients < 65 years, and 9 ± 2.4 months in patients ≥ 65 years (**Figure 6A**, HR 2.76, $p = 0.008$).

MGMT methylation was associated with longer OS, 30 ± 5.2 months in methylated vs. 13 ± 2.5 months in non-methylated (**Figure 6B**, HR = 2.34, $p = 0.044$). Necrosis, tumor mass, and FLAIR-T₂ volumes in non-methylated MGMT tumors were larger than in methylated MGMT tumors: 18.7 vs. 10.7 cm³, 33.9 vs. 23.3 cm³, and 104.3 vs. 82.1 cm³, respectively, without statistical significance (Mann–Whitney U-test $p = 0.161$, 0.204 , and 0.195 , respectively).

Hyperintensity in FLAIR-T₂ involving the corpus callosum had a significant impact in OS, 10 ± 1.08 months when there was involvement of the corpus callosum vs. 19 ± 3.7 months when there was no involvement of the corpus callosum (**Figure 6C**, HR = 3.22, $p = 0.006$).

Gadolinium enhancing tumor, necrosis, and the tumor mass volumes calculated by the 3D ellipsoid and 3D semi-automatic methods did not have any impact on OS and PFS, and the tumor mass area, calculated with the 2D diameter method, was not associated with OS or PFS either.

Figure 7 and **Tables 3–5**, summarizes Kaplan–Meier tests of OS and PFS with pre-operative FLAIR-T₂ volume measurements by the 3D ellipsoid, and semiautomatic segmentation methods, respectively.

FLAIR-T₂ volume ≥ 60 cm³ by the semi-automatic method was associated with shorter OS, with median survival times of 13 ± 1.8 m (≥ 60 cm³) vs. 24 ± 6.5 m (< 60 cm³), respectively (**Figure 7B**, HR = 2.84, $p = 0.024$). A similar impact was observed with the 3D ellipsoid method, with the median survival ranging from 15 ± 1.8 (≥ 60 cm³) to 24 ± 5.8 m (<60 cm³), (**Figure 7A**, HR = 2.35, $p = 0.051$), reaching closely statistical significance. The FLAIR-T₂ volume ≥ 60 cm³ had also impact in progression-free survival by both 3D methods (**Figures 7C,D**); FLAIR-T₂ area $\geq 2,000$ mm² as determined by the 2D diameter method was also associated with shorter OS (HR = 3.06, $p = 0.041$).

Necrosis/Tumor ratio had no impact on survival ($p = 0.798$). The FLAIR-T₂/tumor ratio by the semi-automatic method had a negative impact on survival ($p = 0.008$) without detecting such an association with the 3D ellipsoid and 2D diameter methods.

Multivariate Analysis

Finally, we implemented a multivariate analysis (Cox Regression analysis) strategy to identify the independent predictors of OS among the demographic, imaging, and genetic variables that were significant in the bivariate analysis. We carried out the analysis individualizing the results for each method (**Tables 3–5**). The following variables were involved; age ≥ 65 years, MGMT methylation status, FLAIR-T₂ abnormality ≥ 60 cm³ or $\geq 2,000$ mm³ and FLAIR-T₂/tumor ratio ≥ 5 for all methods.

TABLE 3 | Multivariate Cox Regression analysis with tumor size as determined by the 2D diameter method.

Variable	Unadjusted HR	95% CI	p-value	Adjusted HR	95% CI	p-value
Age ≥ 65 years	2.76	1.30–5.84	0.008	2.85	1.26–6.41	0.011
MGMT Unmethylated	2.34	1.02–5.38	0.044	2.73	1.01–7.47	0.050
FLAIR-T ₂ $\geq 2,000$ mm ²	3.06	1.04–8.97	0.041	3.52	1.11–11.2	0.027
FTR ^a ≥ 5	0.97	0.41–2.34	0.954	1.84	0.68–5.02	0.229

^aFLAIR-T₂/tumor ratio; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval.

TABLE 4 | Multivariate Cox Regression analysis with tumor volumetry as determined by the ellipsoid method.

Variable	Unadjusted HR	95% CI	p-value	Adjusted HR	95% CI	p-value
Age ≥ 65 years	2.76	1.30–5.84	0.008	3.27	1.45–7.38	0.004
MGMT Unmethylated	2.34	1.02–5.38	0.044	2.25	0.98–5.43	0.051
FLAIR-T ₂ ≥ 60 cm ³	2.35	0.95–5.84	0.051	2.83	1.08–7.44	0.034
FTR ^a ≥ 5	1.49	0.69–3.19	0.302	1.43	0.64–3.19	0.321

^aFLAIR-T₂/tumor ratio; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval.

TABLE 5 | Multivariate Cox Regression analysis with tumor volumetry as determined with the semi-automatic method.

Variable	Unadjusted HR	95% CI	p-value	Adjusted HR	95% CI	p-value
Age ≥ 65 years	2.76	1.30–5.84	0.008	3.39	1.51–7.61	0.003
MGMT Unmethylated	2.34	1.02–5.38	0.044	2.53	1.03–6.57	0.046
FLAIR-T ₂ ≥ 60 cm ³	2.84	1.07–7.55	0.024	3.93	1.23–10.2	0.018
FTR ^a ≥ 5	1.02	0.45–2.34	0.956	1.62	0.62–4.18	0.321

^aFLAIR-T₂/tumor ratio; HR, Hazard ratio; CI, confidence interval.

The variable Hyperintensity in FLAIR-T₂ involving the corpus callosum was excluded because did not provide more significance to the multivariate models due to the close association with the variable FLAIR-T₂ volume > 60 cm³ (Fisher's exact test $p = 0.009$). We found that independence of the variables FLAIR-T₂ > 60 cm³, age > 65 years, as well as the MGMT methylation status, remained significant with a similar impact on OS than in the bivariate analysis.

DISCUSSION

Our pilot study investigates the prognostic value of three different methods of pre-surgical tumor size measurement by MRI, combined with relevant clinical and genetic information, as OS and PFS predictors. Briefly, we selected a homogeneous cohort of patients harboring primary glioblastomas (IDH wild type), who were candidates for resective surgery and adjuvant chemoradiotherapy. Tumor sizes and compartments were determined pre-operatively using the 2D diameter method recommended by the RANO (23, 24), the 3D ellipsoid formula (25, 26) and the semi-automatic 3D segmentation (33) methods. Clinical and genetic variables, including gender, age, expression of IDH mutation, and MGMT status, were investigated additionally.

In general, our results confirm the correlation of elderly patients with shorter OS, with the cut-off point in terms of survival prediction in 65 years, as well as the methylated status of the MGMT promoter with longer OS, two well-known variables normally associated with OS and PFS (6, 11). In addition, incomplete neurosurgical resections, considered as important negative survival markers (4, 38–40), depicted in the present study, only a trend to shorter OS without statistical significance, a finding probably related to the relatively small sample of the present patient cohort.

As far as pre-operative measurement of tumor size is concerned, the three methods employed in this study presented a high correlation (41, 42). Despite the semi-automatic segmentation method is currently considered the most accurate, because of its high adaptability to irregular morphologies, and the possibility to determine, separately, the different compartmental volumes (27, 43), its advantages in terms of prognosis over the 2D diameter and the 3D ellipsoid methods, did not reach statistical significance, even in measurements of tumor size in pre-operative images. This may be caused, at least in part, by the relatively homogeneous tumor morphology in the pre-operative period. However, post-surgical images show limits and contours much more difficult to be silhouetted, and consequently, the semi-automatic method is the only one that can provide insight of the actual volume of the post-surgical residual tumor volume.

Among the areas, volumes and ratios investigated, including necrosis, gadolinium enhancement in T₁, tumor mass, necrosis/tumor, and FLAIR-T₂/tumor ratios, only FLAIR-T₂ hyper-intensity had an important impact in OS and PFS, with the three methods of tumor size measurement used. Hyper-intensity in FLAIR-T₂ surrounding tumor mass includes a mixture of peritumoral reactive edema and tumor cells with variable density, as has been previously characterized (44–46).

Present results confirm that, the higher the volume of the FLAIR-T₂ image, the worse the prognosis is. However, there is some controversy in this respect, since some studies have shown correlations between FLAIR-T₂ hyper-intensities with longer OS (13–18, 40, 47), while others have not been able to prove it (12, 13, 48, 49). Many factors, including the non-exclusion of cystic cavities, the influence of corticosteroid treatment, and the inclusion of both, IDH-mutated, and IDH wild-type tumors, may further underlie these discrepancies.

Additionally, some studies have reported associations with survival of the necrosis volume, enhancement tumor volume, and the tumor/necrosis ratio (13, 18, 48). Our study could not confirm these, either in either bivariate or multivariate analyses. However, we observed a trend indicating that the volume of FLAIR-T₂ hyper-intensity, tumor mass, and necrosis, were greater in the tumors with non-methylated MGMT promoter (50). The lower survival of this glioblastoma subgroup is clearly described by its greater resistance to alkylating chemotherapeutic agents, but it could also involve a higher rate of tumor growth, with higher volumes being observed in all measurements when diagnosing the disease, and before any treatment prescribed. Future studies with a larger sample size could contribute to clarify this finding.

Summarizing, our study shows that the size of FLAIR-T₂ hyper-intensity, as measured by the three methods, presents a similar significant impact in the OS and PFS under both, bivariate and multivariate analyses. The larger the FLAIR-T₂ hyper-intensity volume, the shorter OS and PFS predictions. On these basis, surgical resection of the largest part of the FLAIR-T₂ hyperintensity tissue might determine a better prognosis, in agreement with previous studies (40, 51, 52). Additionally we show, that the 3D semi-automatic method, more complex and time consuming than the other alternatives (22, 53), ends up providing similar pre-operative tumor volumetry results, without any preponderance in terms of survival. Consequently, our study supports the use of the 2D diameter and 3D ellipsoid methods, to estimate FLAIR-T₂ hyper-intensity areas and volumes, revealed here as parameters with an important impact in OS and PFS predictions.

Limitations

Acknowledged limitations of this pilot study relate to the single center implementation and the reduced size of the patient cohort. Thus, increasing the number of patients examined and extension to multicenter assays would constitute immediate priorities to validate the present observations.

CONCLUSIONS

The present study reveals that pre-operative tumor size estimations in primary glioblastoma, as determined by the 2D diameter and 3D ellipsoid methods, provide similar results to the 3D semi-automatic segmentation method. The three methods reveal that FLAIR-T₂ hyperintensity areas and volumes, provide independent factors closely associated with OS and PFS predictions. The larger the FLAIR-T₂ hyper-intensity volume, the worse OS and PFS prediction. In addition, we emphasize the

negative impact of age ≥ 65 years and non-methylation of the MGMT promoter in survival predictions.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee University Hospital La Paz, Madrid. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP performed most of the surgeries, collected and integrated the patient data, applied the different volumetric methods to the image database, provided the univariate and multivariate statistical analyses, and wrote the first draft of the manuscript. CV collected and integrated the patient and imaging data, implemented the MRI volumetric methods, and contributed to

the first draft of the manuscript. AB, CU, and AR contributed in the radiologic assessment of pre- and post-operative MRI and validated the volumetric measurements. MG performed many of the surgeries, validated demographic and histopathological assessments, and contributed to the final version of the manuscript. SC and JR integrated all clinical, neurosurgical, and imaging information and accomplished the writing of the final version, with all authors commenting. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported in part by grants PI 2017/00361 from Instituto de Salud Carlos III to JR, MG, and AP and by grant B2017/BMD3688 from the Community of Madrid to JR, MG, and SC.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors wish to express their gratitude to the Neuroradiology and Pathology Departments of the Hospital La Paz, for professional handling of the MRI acquisitions and immunohistochemical determinations.

REFERENCES

- Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA, Ryken TC. Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: surveillance, epidemiology, and end results program, 1973 to 2001. *Neurosurg Focus*. (2006) 20:E1. doi: 10.3171/foc.2006.20.4.E1
- Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*. (2015) 17(Suppl 4):iv1-62. doi: 10.1093/neuonc/nov189
- Hou LC, Veeravagu A, Hsu AR, Tse VCK. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg Focus*. (2006) 20:E5. doi: 10.3171/foc.2006.20.4.2
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. (2009) 10:459-66. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7
- Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. (2013) 19:764-72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. (2016) 131:803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
- Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res*. (2009) 15:6002-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0715
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. (2000) 343:1350-4. doi: 10.1056/NEJM200011093431901
- Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. (2005) 352:997-1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331
- Gandia-González ML, Cerdán S, Barrios L, López-Larrubia P, Feijóo PG, Palpan A Jr, et al. Assessment of overall survival in glioma patients as predicted by metabolomic criteria. *Front Oncol*. (2019) 9:328. doi: 10.3389/fonc.2019.00328
- Lacroix M, Abi-Said D, Fournier DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*. (2001) 95:190-8. doi: 10.3171/jns.2001.95.2.0190
- Iliadis G, Kotoula V, Chatzistiriou A, Televantou D, Eleftheraki AG, Lambaki S, et al. Volumetric and MGMT parameters in glioblastoma patients: survival analysis. *BMC Cancer*. (2012) 12:3. doi: 10.1186/1471-2407-12-3
- Henker C, Kriesen T, Glass A, Schneider B, Piek J. Volumetric quantification of glioblastoma: experiences with different measurement techniques and impact on survival. *J Neurooncol*. (2017) 135:391-402. doi: 10.1007/s11060-017-2587-5
- Hammoud MA, Sawaya R, Shi W, Thall PF, Leeds NE. Prognostic significance of preoperative MRI scans in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. (1996) 27:65-73. doi: 10.1007/BF00146086
- Pope WB, Sayre J, Perlina A, Villablanca JP, Mischel PS, Cloughesy TF. MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol*. (2005) 26:2466-74.
- Li W-B, Tang K, Chen Q, Li S, Qiu X-G, Li S-W, et al. MRI manifestations correlate with survival of glioblastoma multiforme patients. *Cancer Biol Med*. (2012) 9:120-3. doi: 10.3969/j.issn.2095-3941.2012.02.007
- Schoenegger K, Oberndorfer S, Wuschitz B, Struhal W, Hainfellner J, Prayer D, et al. Peritumoral edema on MRI at initial diagnosis: an independent prognostic factor for glioblastoma? *Eur J Neurol*. (2009) 16:874-8. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02613.x
- Wu C-X, Lin G-S, Lin Z-X, Zhang J-D, Chen L, Liu S-Y, et al. Peritumoral edema on magnetic resonance imaging predicts a poor clinical outcome in malignant glioma. *Oncol Lett*. (2015) 10:2769-76. doi: 10.3892/ol.2015.3639
- Pierallini A, Bonamini M, Osti MF, Pantano P, Palmeggiani F, Santoro A, et al. Supratentorial glioblastoma: neuroradiological findings and survival after surgery and radiotherapy. *Neuroradiology*. (1996) 38(Suppl 1):S26-30. doi: 10.1007/BF02278114
- Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, Cairncross JG. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol*. (1990) 8:1277-80. doi: 10.1200/JCO.1990.8.7.1277

21. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol.* (2010) 28:1963–72. doi: 10.1200/JCO.2009.26.3541
22. Dempsey MF, Condon BR, Hadley DM. Measurement of tumor “size” in recurrent malignant glioma: 1D, 2D, or 3D? *AJNR Am J Neuroradiol.* (2005) 26:770–6.
23. Wen PY, Chang SM, Van den Bent MJ, Vogelbaum MA, Macdonald DR, Lee EQ. Response assessment in neuro-oncology clinical trials. *J Clin Oncol.* (2017) 35:2439–49. doi: 10.1200/JCO.2017.72.7511
24. Ellingson BM, Wen PY, Cloughesy TF. Modified criteria for radiographic response assessment in glioblastoma clinical trials. *Neurotherapeutics.* (2017) 14:307–20. doi: 10.1007/s13311-016-0507-6
25. Opalak CF, Parry M, Rock AK, Sima AP, Carr MT, Chandra V, et al. Comparison of ABC/2 estimation and a volumetric computerized method for measurement of meningiomas using magnetic resonance imaging. *J Neurooncol.* (2019) 144:275–82. doi: 10.1007/s11060-019-03205-z
26. Leu S, Boulay J-L, Thommen S, Bucher HC, Stippich C, Mariani L, et al. Preoperative two-dimensional size of glioblastoma is associated with patient survival. *World Neurosurg.* (2018) 115:e448–63. doi: 10.1016/j.wneu.2018.04.067
27. Sorensen AG, Patel S, Harmath C, Bridges S, Synnott J, Sievers A, et al. Comparison of diameter and perimeter methods for tumor volume calculation. *J Clin Oncol.* (2001) 19:551–7. doi: 10.1200/JCO.2001.19.2.551
28. Czarnek N, Clark K, Peters KB, Mazurowski MA. Algorithmic three-dimensional analysis of tumor shape in MRI improves prognosis of survival in glioblastoma: a multi-institutional study. *J Neurooncol.* (2017) 132:55–62. doi: 10.1007/s11060-016-2359-7
29. Vandembroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, et al. Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE). *Epidemiology.* (2007) 18:805–35. doi: 10.1097/EDE.0b013e3181577511
30. Nabors LB, Portnow J, Ammirati M, Baehring J, Brem H, Butowski N, et al. NCCN guidelines insights: central nervous system cancers, version 1.2017. *J Natl Compr Cancer Netw.* (2017) 15:1331–45. doi: 10.6004/jncn.2017.0166
31. Henegar MM, Moran CJ, Silbergeld DL. Early postoperative magnetic resonance imaging following nonneoplastic cortical resection. *J Neurosurg.* (1996) 84:174–9. doi: 10.3171/jns.1996.84.2.0174
32. Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn J-C, Pentheroudakis G. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* (2014) 25(suppl 3):iii93–101. doi: 10.1093/annonc/mdl0050
33. Sreenivasan S, Madhugiri V, Sasidharan G, Kumar RR. Measuring glioma volumes: A comparison of linear measurement based formulae with the manual image segmentation technique. *J Cancer Res Ther.* (2016) 12:161. doi: 10.4103/0973-1482.153999
34. Setty P, Hammes J, Rothämel T, Vladimirova V, Kramm CM, Pietsch T, et al. A pyrosequencing-based assay for the rapid detection of IDH1 mutations in clinical samples. *J Mol Diagn.* (2010) 12:750–6. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090237
35. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* (2000) 28:E32. doi: 10.1093/nar/28.8.e32
36. Sawaya R, Hammoud M, Schoppa D, Hess KR, Wu SZ, Shi W-M, et al. Neurosurgical outcomes in a modern series of 400 craniotomies for treatment of parenchymal tumors. *Neurosurgery.* (1998) 42:1044–55. doi: 10.1097/00006123-199805000-00054
37. Mor V, Liberte L, Morris JN, Wiemann M. The Karnofsky performance status scale: An examination of its reliability and validity in a research setting. *Cancer.* (1984) 53:2002–7. doi: 10.1002/1097-0142(19840501)53:9<2002::AID-CNCR2820530933>3.0.CO;2-W
38. Sanai N, Polley M-Y, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg.* (2011) 115:3–8. doi: 10.3171/2011.2.JNS10998
39. Keles GE, Anderson B, Berger MS. The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. *Surg Neurol.* (1999) 52:371–9. doi: 10.1016/S0090-3019(99)00103-2
40. Li YM, Suki D, Hess K, Sawaya R. The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: can we do better than gross-total resection? *J Neurosurg.* (2016) 124:977–88. doi: 10.3171/2015.5.JNS142087
41. Porz N, Bauer S, Pica A, Schucht P, Beck J, Verma RK, et al. Multi-modal glioblastoma segmentation: man versus machine. Strack S, editor. *PLoS One.* (2014) 9:e96873. doi: 10.1371/journal.pone.0096873
42. Chang K, Beers AL, Bai HX, Brown JM, Ly KI, Li X, et al. Automatic assessment of glioma burden: a deep learning algorithm for fully automated volumetric and bidimensional measurement. *Neuro Oncol.* (2019) 21:1412–22. doi: 10.1093/neuonc/noz106
43. Gahrmann R, van den Bent M, van der Holt B, Vernhout RM, Taal W, Vos M, et al. Comparison of 2D (RANO) and volumetric methods for assessment of recurrent glioblastoma treated with bevacizumab—a report from the BELOB trial. *Neuro Oncol.* (2017) 19:853–61. doi: 10.1093/neuonc/now311
44. Eidel O, Burth S, Neumann J-O, Kieslich PJ, Sahn F, Jungk C, et al. Tumor infiltration in enhancing and non-enhancing parts of glioblastoma: a correlation with histopathology. Kleinschnitz C, editor. *PLoS One.* (2017) 12:e0169292. doi: 10.1371/journal.pone.0169292
45. Tamura R, Ohara K, Sasaki H, Morimoto Y, Yoshida K, Toda M. Histopathological vascular investigation of the peritumoral brain zone of glioblastomas. *J Neurooncol.* (2018) 136:233–41. doi: 10.1007/s11060-017-2648-9
46. Zinn PO, Mahajan B, Majadan B, Sathyan P, Singh SK, Majumder S, et al. Radiogenomic mapping of edema/cellular invasion MRI-phenotypes in glioblastoma multiforme. Deutsch E, editor. *PLoS One.* (2011) 6:e25451. doi: 10.1371/journal.pone.0025451
47. Ramnarayan R, Dodd S, Das K, Heidecke V, Rainov NG. Overall survival in patients with malignant glioma may be significantly longer with tumors located in deep grey matter. *J Neurol Sci.* (2007) 260:49–56. doi: 10.1016/j.jns.2007.04.003
48. Henker C, Hiepel MC, Kriesen T, Scherer M, Glass A, Herold-Mende C, et al. Volumetric assessment of glioblastoma and its predictive value for survival. *Acta Neurochir (Wien).* (2019) 161:1723–32. doi: 10.1007/s00701-019-03966-6
49. Gutman DA, Cooper LAD, Hwang SN, Holder CA, Gao J, Aurora TD, et al. MR Imaging predictors of molecular profile and survival: multi-institutional study of the TCGA glioblastoma data set. *Radiology.* (2013) 267:560–9. doi: 10.1148/radiol.13120118
50. Chahal M, Xu Y, Lesniak D, Graham K, Famulski K, Christensen JG, et al. MGMT modulates glioblastoma angiogenesis and response to the tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Neuro Oncol.* (2010) 12:822–33. doi: 10.1093/neuonc/noq017
51. Molinaro AM, Hervey-Jumper S, Morshed RA, Young J, Han SJ, Chunduru P, et al. Association of maximal extent of resection of contrast-enhanced and non-contrast-enhanced tumor with survival within molecular subgroups of patients with newly diagnosed glioblastoma. *JAMA Oncol.* (2020) 6:495–503. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.6143
52. Boxerman JL, Zhang Z, Safriel Y, Rogg JM, Wolf RL, Mohan S, et al. Prognostic value of contrast enhancement and FLAIR for survival in newly diagnosed glioblastoma treated with and without bevacizumab: results from ACRIN 6686. *Neuro Oncol.* (2018) 20:1400–10. doi: 10.1093/neuonc/noy049
53. Egger J, Kapur T, Fedorov A, Pieper S, Miller J V., Veeraraghavan H, et al. GBM volumetry using the 3D slicer medical image computing platform. *Sci Rep.* (2013) 3:1364. doi: 10.1038/srep01364

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Palpan Flores, Vivancos Sanchez, Roda, Cerdán, Barrios, Utrilla, Royo and Gandía González. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.