



**Facultad de  
Ciencias de la Salud**  
Universidad de La Laguna

# “ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD81 EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA MULTIFORME”

Grado en Medicina

Universidad de La Laguna

## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

Autora:

Sofía Lorenzo Pérez

Tutores:

José Luis González Mora

*Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad de La Laguna*

Julio Manuel Plata Bello

*Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario de Canarias*

*San Cristóbal de La Laguna, 15 de junio de 2020*

## ÍNDICE

1. Resumen y abstract	3
2. Introducción	4
3. Hipótesis del trabajo y objetivos	9
4. Material y métodos	10
5. Resultados	16
6. Discusión	22
7. Conclusión	25
8. ¿Qué he aprendido durante este TFG?	26
9. Bibliografía	27
10. Anexos	32

## RESUMEN

El glioblastoma es el tumor maligno primario más común del SNC, contando con un pronóstico pobre a pesar del tratamiento agresivo que se aplica, por lo que resulta paliativo y no curativo. Esto ha generado la necesidad de buscar nuevas dianas terapéuticas que puedan mejorar el curso natural actual de la enfermedad, por lo que este estudio se ha centrado en analizar la expresión de CD81, una proteína transmembrana prometedora con importancia en procesos tanto neoplásicos como no, en pacientes con glioblastoma incluidos en la base de datos del *The Cancer Genome Atlas*, determinando las diferencias estadísticas de 2 grupos de pacientes divididos según su grado de expresión de CD81. Los resultados sugieren que una alta expresión de CD81 es un marcador pronóstico desfavorable.

**Palabras clave:** Glioblastoma, CD81, diana terapéutica, pronóstico, microARN

## ABSTRACT

The glioblastoma is the most common primary tumor in the nervous system, and it has a poor prognosis despite the aggressive treatment, that is paliative and not curative. This has created the need of searching for new targets that can improve the natural course of the disease, so this study has analized the expression of CD81, a transmembrane protein implicated in different medical processes, including neoplastic and no neoplastic ones, in patients with glioblastoma included in the database of *The Cancer Genome Atlas*, determining the statistical differences between 2 groups of patients divided according to their expression of CD81. The results suggest that a high expression of CD81 is a bad prognosis factor.

**Keywords:** Glioblastoma, CD81, target, prognosis, microRNA

# INTRODUCCIÓN

## GENERALIDADES

El glioblastoma (GB) es el tumor maligno primario más común del Sistema Nervioso central, con una incidencia aproximada de 3.19 casos / 100000 habitantes. Puede surgir a cualquier edad, es más común en la franja comprendida entre la 5ª y 7ª década de vida, resultando en una edad media al diagnóstico de 64 años <sup>(1)</sup>. Su pronóstico es pobre y su supervivencia, escasa, llegando apenas a 3 meses si no es tratado y, si se aporta tratamiento con cirugía y radio-quimioterapia, la mediana de supervivencia ronda los 14 meses. Es más frecuente en varones, blancos y localización supratentorial <sup>(2)</sup>. No se han identificado claros factores de riesgo, aunque sí se ve relacionado con la exposición previa a radiación ionizante (ej: radioterapia previa como tratamiento de otro tumor) o patologías cromosómicas como pérdidas genéticas en el cromosoma 10 <sup>(2)</sup> o síndromes como Lynch, Li-Fraumeni o la neurofibromatosis tipo 1 <sup>(3)</sup>. No guarda relación con el consumo de tabaco, alcohol u otras drogas.

Normalmente, la primera manifestación de la existencia de un glioblastoma es la sintomatología, que es muy variada y llamativa, e incluye dolor de cabeza, náuseas o vómitos, confusión, pérdida de memoria etc. La existencia de uno o varios de estos síntomas debe hacer sospechar de la existencia de una anomalía, confirmándose con la presencia en pruebas de imágenes de un proceso expansivo intracraneal. En el caso específico del GB, la resonancia magnética es el estudio de imagen de elección. Se observa como una lesión ocupante de espacio con bordes irregulares, que suele captar contraste y presentar necrosis central y edema peritumoral. Aun así, el diagnóstico definitivo se hace extrayendo una biopsia <sup>(5)</sup>.

Los glioblastomas se pueden clasificar como primarios o secundarios. Los GB primarios son aquellos que surgen “de novo” (más frecuentes), mientras que los secundarios aparecen como consecuencia de la progresión de un astrocitoma de menor grado. Normalmente se reconocen ya que los secundarios tienen la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) 1 y/o 2 mutadas.

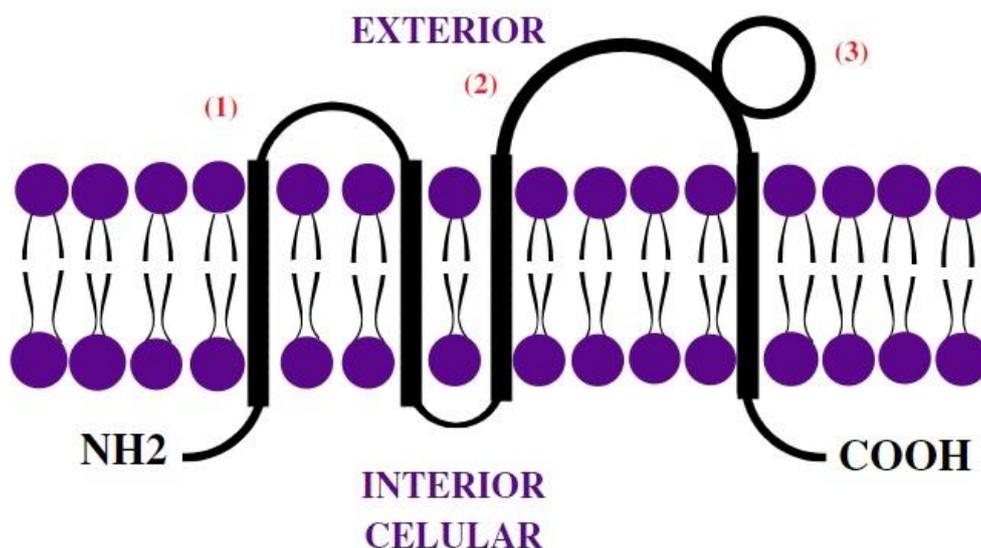
El tratamiento complejo y multidisciplinar, aunque básicamente se resume en 3 pilares terapéuticos: Cirugía, que busca reseca el máximo tumor posible, para lo que se ayuda de ácido 5-aminolevulínico (ALA), un elemento fluorescente que tiñe el tumor <sup>(6)</sup>,

radioterapia, normalmente con una dosis total de 54-60 Gy dividida en fracciones de 1.8-2 Gy <sup>(5)</sup> y quimioterapia con temozolamida, que transfiere grupos alquilo a las bases de guanina (causando daños en el ADN) <sup>(5)</sup>. También se pueden asociar otros fármacos, como son anticomiciales en caso de sufrir crisis epilépticas.

Como se indicó previamente, a pesar de este tratamiento, el pronóstico sigue siendo desesperanzador, con una mediana de supervivencia de 14 meses, por lo que se siguen requiriendo esfuerzos para profundizar en la investigación de este tumor. Por esto han surgido proyectos como el TCGA (The Cancer Genome Atlas), que recoge datos y características en distintas categorías como la clínica, mutaciones, expresión de genes etc, de gran variedad de tumores <sup>(9)</sup>.

Esto permite, en el caso del GB, profundizar en el estudio de sus características moleculares, con el fin de comprender mejor su biología y poder identificar nuevas dianas terapéuticas.

CD81 (*Cluster of Differentiation 81*), también llamada (Target of the Antiproliferative Antibody 1), TSPAN28 (tetraspanina 28), S5.7 o CVID6, es una proteína humana perteneciente al grupo de las tetraspaninas (o proteínas de membrana 4) y sintetizada por el gen homónimo, localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5) y que tiene una longitud de 20103 bases nitrogenadas <sup>(10)</sup>.



**FIGURA 1: Estructura de CD81.** Proteína de 236 aminoácidos de longitud que tiene 4 dominios transmembrana con ambos extremos (N y C-terminal) en el interior celular. LEYENDA: (1) Dominio extracelular corto / (2) Dominio extracelular largo / (3) Motivo CCG. Adaptado de la tesis doctoral de Gilsanz A (2012).

Este gen está situado en la región supresora de tumores, en la que se encuentra por ejemplo el gen HRAS que codifica la proteína H-Ras, involucrada en la regulación de la división celular, y cuya mutación se relaciona con ciertos cánceres de vejiga, por lo que se cree que CD81 también puede contribuir al desarrollo de ciertos tumores malignos. <sup>(11)</sup>

La proteína que codifica fue descubierta haciendo *screening* de distintos anticuerpos monoclonales capaces de inhibir la proliferación de los linfomas de células B, tras lo que fue descrita su importancia en el sistema inmune tras estudios en ratones. De la misma forma que otras tetraspaninas, se ha descrito su influencia en gran cantidad de funciones, entre ellas activación, adhesión y proliferación de linfocitos B y T y otras células <sup>(12)</sup>.

También está relacionado con el desarrollo de enfermedades no tumorales, destacando entre ellas enfermedades hepáticas como la hepatitis por Virus de la Hepatitis C (VHC), ya que se ha visto que es necesaria para la entrada del virus a los hepatocitos, por lo que se está estudiando el posible uso de distintas terapias, incluyendo anticuerpos monoclonales anti-CD81, con el fin de inhibir esta entrada. Es un campo de estudio especialmente prometedor ya que al tener como diana un receptor celular y no un componente del virus, se evita la creación por parte de éstos de resistencias a los fármacos antivirales <sup>(28)</sup>. Otro fármaco estudiado es el erlotinib, inhibidor del EGFR (factor de crecimiento epidermal), factor que se activa tras la unión del CD81-VHC, por lo que inhibir la activación del EGFR puede generar un efecto inhibitorio en la entrada del virus en modelos *in vitro* <sup>(28)</sup>.

Su importancia ha sido también reconocida en la infección por *Plasmodium*, ya que CD81 es clave para la entrada al cuerpo de los esporozoítos, que son la fase hepática del protozoo productor de la malaria.

## **RELACIÓN ENTRE GLIOBLASTOMA Y CD81**

La función de distintas tetraspaninas ha sido estudiada los últimos años en varios tipos de neoplasias. Ejemplo de ello es CD9, que ha sido estudiada en procesos como la metastatización de tumores y que se ha encontrado en gran cantidad de tejidos, como el pulmonar, mamario o colorrectal <sup>(25)</sup>, mientras que de CD81, el conocimiento es mucho más limitado.

CD81 no es específica de ningún tejido, lo que quiere decir que se encuentra en prácticamente la totalidad de nuestro organismo, siendo los tejidos que más la expresan el ovario, endometrio y testículos, teniendo una expresión intermedia en el tejido cerebral <sup>(19)</sup>.

La investigación de esta tetraspanina ha versado, mayoritariamente, sobre su papel en el campo infeccioso (con especial énfasis en su función en la entrada de distintos virus hepáticos, como ya comentamos), siendo menor en el de las neoplasias <sup>(26)</sup>, aunque, aun así, se ha determinado que es un factor pronóstico favorable en tumores pancreáticos, y desfavorable en tumores colorrectales y gliomas. <sup>(19)</sup>

Algunos de los pequeños avances que se han conseguido investigando esta proteína es que se ha visto que, en los exosomas, que son nanovesículas de 30-120 nm que normalmente se encuentran aumentadas en fluidos de pacientes con cáncer, las tetraspaninas son un elemento vital en la selección de sus células diana, llegando a promover procesos como la motilidad de células cancerígenas, metástasis o angiogénesis. Muestra del papel fundamental de las tetraspaninas en la transferencia de información intercelular es que se ha visto que los ovocitos deficientes en CD9 o CD81 no se pueden fusionar con espermatozoides. <sup>(24)</sup>

En el caso del GB, CD81 se suele encontrar sobreelevada, al igual que CD9, mientras que EW-2, una proteína transmembrana perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas que se cree que puede actuar como supresor del desarrollo de glioblastoma, se encuentra disminuida (se ha visto que los niveles de EW-2 afectan a la cantidad de estas tetraspaninas) <sup>(23)</sup>. A pesar de esto, la proteína CD81 no ha sido estudiada en el ámbito del glioblastoma.

## **POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS FRENTE A CD81**

A pesar de su claro papel en la génesis y progresión tumoral, los anticuerpos anti-CD81 no han sido usados en el cáncer, posiblemente porque la expresión de CD81 en gran cantidad de órganos, y se teme que su uso pueda dañar no sólo al tumor, sino también a tejidos sanos, aunque recientes estudios con monos *cynomolgus* no han evidenciado toxicidad fuera del órgano diana. Esto ha dado pie a empezar investigaciones basadas en

el uso de anticuerpos anti-CD81, que han resultado prometedoras en el linfoma de células B. <sup>(12)</sup>

Por lo tanto, el GB es el tumor primario más frecuente en el SNC, con un pronóstico poco favorable. Por este motivo se precisa la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que puedan modificar su curso natural. Entre estas posibles dianas terapéuticas se encuentra CD81, una proteína de membrana involucrada en la activación y proliferación de linfocitos B y T y que ha demostrado estar implicada en la evolución de algunas neoplasias como linfomas no Hodgkin. Además, se han desarrollado fármacos (aún en fase experimental) que podrían tener como diana dicha proteína.

## **OBJETIVOS**

### ***OBJETIVO PRINCIPAL***

- Analizar la expresión de CD81 a nivel de ARNm en pacientes incluidos en la base de datos del TCGA e identificar sus implicaciones pronósticas.

### ***OBJETIVOS SECUNDARIOS***

- Analizar las diferencias clínicas y moleculares entre pacientes con alta y baja expresión de CD81.
- Estudiar el efecto de la expresión de microARNs que modulan la expresión de CD81 en el valor pronóstico de esta molécula.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseña un estudio retrospectivo usando los pacientes diagnosticados de Glioblastoma recogidos en la base de datos pública del TCGA (The Cancer Genome Atlas).

Los pacientes que se incluyeron en el estudio cumplían con los siguientes criterios de inclusión y ninguno de exclusión:

- **CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

- Pacientes incluidos en la base de datos “*PanCancer Atlas*” del TCGA (The Cancer Genome Atlas) con el diagnóstico de glioblastoma.
- Que en la citada base de datos se recojan datos de expresión de RNA (RNAseq).

- **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes con mutaciones de IDH1 y/o IDH2, es decir, con glioblastoma secundario.
- Pacientes con mutaciones en CD81
- Pacientes cuya muestra proceda de un GB recurrente.
- Pacientes cuyas muestras recogidas pertenezcan a tejido sano

### PACIENTES

Tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión, se seleccionaron un total de 141 pacientes. Presentaban una edad media de 61,01 años (SD=12,52), siendo 50 de ellos mujeres. Las características clínicas y moleculares de la muestra se encuentran registradas en la *tabla suplementaria 2*.

### EXTRACCIÓN DE DATOS DEL TCGA

Los datos del TCGA fueron descargados de Firebrowse (<http://firebrowse.org>) (versión 2016\_01-28). Como ya se mencionó, sólo se incluyeron pacientes de los que estuvieran disponibles datos de RNAseq.

También han sido incluidos datos clínicos, mutacionales, variaciones en el número de copias, expresión de miRNA y datos de metilación (06-metilguanina-ADN-metiltransferasa [MGMT]) en una nueva base de datos.

Cabe destacar que los datos de expresión de miRNA y metilación no estaban disponibles en todos los pacientes. Los detalles de la generación de estos datos han sido descritos en los estudios realizados por Brennan et al. (2013) y Verhaak et al. (2010) <sup>(9, 21)</sup>.

## **IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES DE IDH1 E IDH2**

Para seleccionar específicamente a pacientes con glioblastoma primario, la presencia de mutaciones en isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y/o isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2) fueron descartadas, ya que son indicador de que el tumor ha sido la progresión de un astrocitoma de menor grado.

Hemos analizado el estado mutacional de ambos genes y descartado aquellos pacientes con cualquier tipo de mutación en éstos (7 pacientes con mutación de IDH1 y 1 con mutación de IDH2), ya que el pronóstico es significativamente diferente <sup>(4)</sup>.

## **ANÁLISIS DE METILACIÓN DE MGMT EN PACIENTES DEL TCGA**

De la cohorte de pacientes del TCGA incluidos en el presente estudio, el estado de metilación estuvo disponible para 117 pacientes.

Determinar el estado de metilación de MGMT es vital ya que es un factor pronóstico por ser determinante de la quimiosensibilidad del tumor (la temozolamida se basa en añadir grupos alquilo al ADN, que la MGMT, al ser una proteína encargada de la reparación del ADN, elimina, cosa que no hace cuando se encuentra metilada) <sup>(2)</sup>.

En 67 de ellos el estado de metilación se evaluó usando la plataforma HumanMethylation27 (HM27) y el resto de los pacientes con la plataforma HumanMethylation (M450). Algunos pacientes presentaban datos en ambas plataformas, por lo que primero se comprobó la ausencia de diferencias significativas entre las muestras de las 2 plataformas empleando la prueba t de Student.

Posteriormente, los datos fueron fusionados promediando los valores beta de las islas CpG de interés. El estado de metilación de MGMT se determinó como ha sido explicado en otros trabajos <sup>(9)</sup>. En resumen, hemos transformado los valores beta en valores M usando esta fórmula:

$$\# M = \log 2 \left( \frac{Beta}{1 - Beta} \right)$$

Posteriormente, calculamos la  $\logit(y)$  usando el modelo propuesto por Bady et al (2012), donde solo el valor M de 2 islas CpG de MGMT fueron considerados (cg12434587 y cg12981137):

$$\# \logit(y) = 4.3215 + 0.5271 * cg12434587 + 0.9265 * cg12981137$$

Según lo propuesto por Bady et al. (2012), usamos un punto de corte de 0.358 el cual empíricamente maximizaba la suma de la sensibilidad y la especificidad. <sup>(8)</sup>

## **DATOS DE RNASEQ DE PACIENTES DEL TCGA**

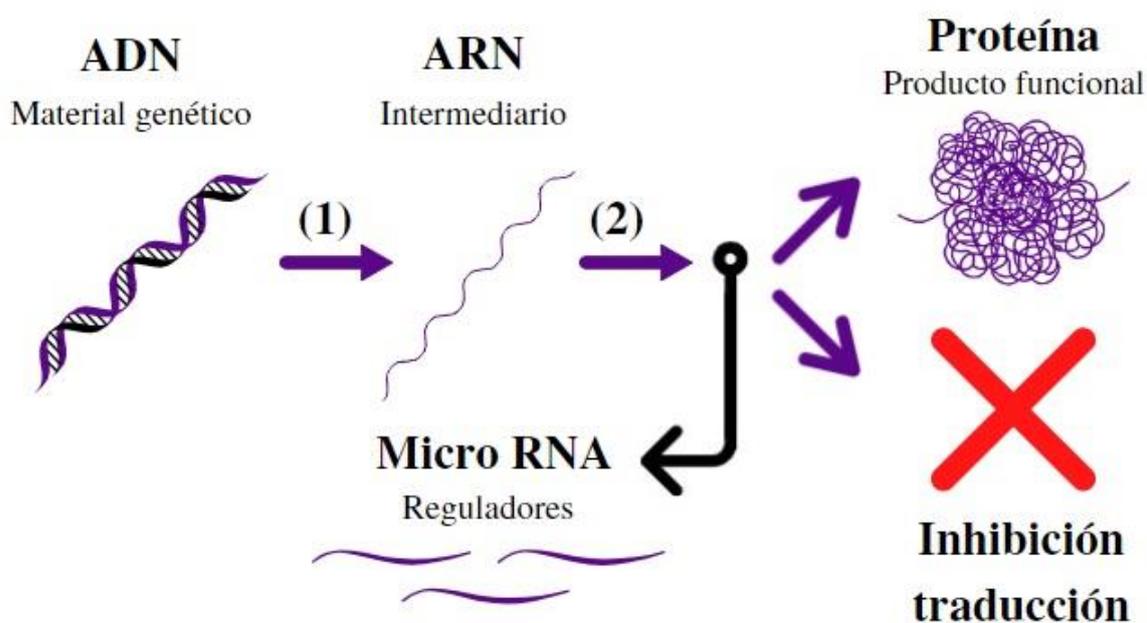
La expresión del ARNm del CD81 fue extraído como explicamos anteriormente. La expresión de CD81 presentaba una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov,  $p=0.150$ ) y se usaron sus valores estandarizados (Z) para el análisis estadístico. Además, la expresión del ARNm de CD81 fue dicotomizada (usando la mediana como punto de corte) generando dos grupos de expresión. Esta variable fue utilizada para las curvas Kaplan-Meier y la prueba de Log-Rank.

Aparte de la expresión del ARN de CD81, el perfil de expresión de otros genes se extrajo para efectuar una clasificación molecular. Como se ha descrito ampliamente en trabajos previos, hay diferencias en la expresión genética del glioblastoma que permite su clasificación en los subtipos proneural, neural, clásico y mesenquimal. <sup>(21,31)</sup>

Usando la lista de los genes más expresados en cada subtipo ([http://tcga-data.nci.nih.gov/docs/publications/gbm\\_exp/](http://tcga-data.nci.nih.gov/docs/publications/gbm_exp/)), hemos realizado un análisis jerárquico no supervisado (MORPHEUS, Broad Institute, <http://software.broadinstitute.org/morpheus/>) y cada paciente fue asignado a un subgrupo molecular (*tabla suplementaria 2*)

## DATOS DE EXPRESIÓN DE MICROARN DE PACIENTES DEL TCGA

La traducción proteica del ARNm de CD81 está regulada por microARN, ya que se encargan de mediar la expresión postranscripcional de los distintos genes al inhibir la traducción de proteínas o al desestabilizar ciertos elementos implicados en la transcripción.



**FIGURA 2: Función de los micro RNA en la síntesis de proteínas.** LEYENDA: (1): Transcripción / (2) Traducción

Por ello, hemos usado bases de datos públicas de microARN (mirDB [<http://www.mirdb.org>]) y mirANDA [<http://www.microrna.org/microrna/home.do>]) para identificar los microRNA que tienen como diana a CD81. De esta lista de microARN (*tabla suplementaria 3*), sólo hsa-miR-582-5p ha demostrado previamente un papel en la patogénesis del glioblastoma. <sup>(14)</sup>

Por lo tanto, los datos de expresión de este microARN fueron incluidos en la base de datos para futuros análisis. Los datos de expresión de este microARN fueron dicotomizados usando la mediana como punto de corte. Esta nueva variable fue incluida en un análisis de supervivencia estratificado con los grupos de expresión de CD81.

## **VARIACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS Y MUTACIONES DEL ADN**

Los archivos de variación en el número de copias y de mutaciones fueron descargados como ha sido indicado anteriormente. Tras excluir aquellos pacientes cuyos datos de RNAseq no estaban disponibles, los 10 genes más comúnmente relacionados con el cáncer que muestran alteraciones en el número de copias (CNA – copy number alterations) y/o mutaciones fueron estudiados.

Esos genes (*tablas suplementarias 3 y 4*) fueron identificados de toda la cohorte de glioblastoma del TCGA cuyo análisis se encuentra en cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>). Se realizó un análisis comparativo de la distribución de esos eventos genéticos entre ambos grupos según la expresión de CD81.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA MUESTRA**

Para estudiar las diferencias entre los grupos de baja y alta expresión de CD81, se usó la mediana para generar 2 grupos de expresión. Se utilizaron test estadísticos no paramétricos (U de Mann-Whitney para variables continuas y test de Chi-cuadrado/ test exacto de Fisher para variables discretas). La significación estadística fue considerada cuando el p-valor < 0.05.

Igualmente, teniendo en cuenta el gran número de comparaciones durante el análisis de las características moleculares, se usó un p valor corregido para estas variables, usando el método de *False Discovery Rate (FDR)*. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $FDR < 0.1$ .

Se llevó a cabo un análisis de regresión de Cox univariante y multivariante, siendo incluidos los parámetros clínicos, radiológicos y moleculares en el análisis univariante y aquellos con una p-valor < 0.1 fueron incluidos en el modelo multivariante. Las diferencias en la mediana de supervivencia global entre grupos de expresión de CD81 fueron analizadas con las curvas de Kaplan-Meier y la prueba de Log-Rank. Se consideró estadísticamente significativo para el análisis de supervivencia un p-valor < 0.05.

Finalmente, los datos de expresión de hsa-miR-582-5p fueron considerados para el análisis post-hoc. Se llevó a cabo un análisis de supervivencia estratificado en base al nivel de expresión de hsa-miR-582-5p y de expresión de CD81.

## **ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO**

Los datos clínico-moleculares de los pacientes incluidos en el estudio se encuentran disponibles en la base de datos pública *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, de forma totalmente anónima y sin vulnerar la privacidad de datos de ninguno de los pacientes.

La realización del trabajo se ha llevado a cabo de acuerdo con la política de publicaciones del TCGA y el comité ético local ha aprobado el estudio de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

## RESULTADOS

### EXPRESIÓN DE CD81 EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA

La expresión media del ARN de CD81 fue 18930.79 RPKM (reads per kilobase million) (SD=5552.3) (de los datos de ARNseq V2). La expresión media de CD81 en el cerebro normal fue establecida en estudios previos sobre 116.02 RPKM +/- 32.589 (datos extraídos de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Teniendo esto en cuenta, toda la cohorte de pacientes incluida en el estudio mostraba una sobreexpresión del ARN de CD81.

### VALOR PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DE CD81 EN LA COHORTE DEL TCGA DE PACIENTES CON GLIOBLASTOMA

La regresión de Cox univariante mostró que la expresión de CD81 se asociaba a un peor pronóstico en relación con la supervivencia global (HR=1.204, 95% C.I. [0.983 -1.473], p=0.072) (tabla 1). También incluyó otras variables clínicas y moleculares. La asociación de la expresión de ARN de CD81 con una peor supervivencia global se siguió observando en el análisis de regresión multivariante donde se incluyó junto con la edad (la única variable que también mostró una significación estadística en el análisis de regresión de Cox univariante [p<0.1]) (tabla 1).

**TABLA 1: Regresión de Cox que busca evaluar el efecto clínico y molecular en la supervivencia total dentro de la cohorte de pacientes del TCGA**

Regresión de Cox de 1 variable				
Variable		Hazard Ratio	95% C.I.	p-valor
Edad		1.038	1.017 – 1.058	<b>0.000*</b>
Sexo				
	Femenino	1.304	0.868 – 1.958	.201
	Masculino	0.767	0.511 – 1.152	.201
Karnofsky>70		0.746	0.347 – 1.601	.452
Clasificación molecular				

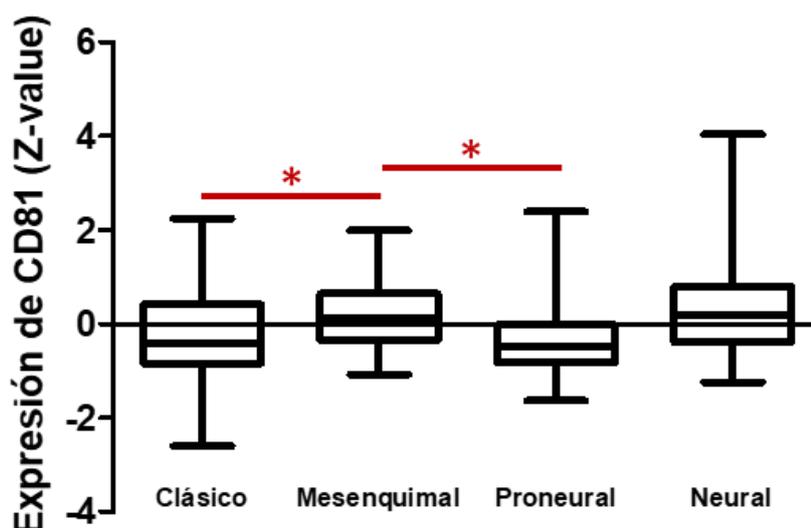
	Clásico	0.713	0.456 – 1.113	.137
	Mesenquimal	1.132	0.727 – 1.764	.584
	Proneural	1.183	0.728 – 1.923	.497
	Neural	1.137	0.700 – 1.847	.604
Metilación de MGMT		0.714	0.443 – 1.152	.167
Expresión de CD81 (Z)		1.204	0.983 – 1.473	<b>.072</b>
Fracción del genoma alterado		0.594	0.123 – 2.873	.517
Aneuploidías		0.994	0.980 – 1.009	.426
Mutaciones		1.001	0.999 – 1.003	0.254
<b>Regresión de Cox multivariable</b>				
Variable		Hazard Ratio	95 % C.I.	p-valor
Edad		1.039	1.018 – 1.059	<b>.00001</b>
Expresión de CD81 (Z)		1.226	1.003 – 1.499	<b>.047</b>

### COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS CON ALTA Y BAJA EXPRESIÓN DE CD81 EN LA COHORTE LOCAL DE PACIENTES CON GLIOBLASTOMA

Tras la dicotomización de la muestra y la consecuente división de los pacientes en 2 grupos según la mediana de expresión de CD81 ( $p_{50}=17725.07$ ), punto de corte elegido al considerarse la mejor forma para mostrar diferencias pronósticas (*figura suplementaria 2*); se observa que los pacientes que pertenecen al grupo de menor expresión tienen una edad media de 60.01 años ( $SD=12,98$ ) al diagnóstico, mientras que los de mayor expresión contaban con una edad ligeramente mayor, 62 años ( $SD=12.06$ ). La distribución por sexos se mantuvo (25:46 frente a 25:47) y el Karnofsky resultó ligeramente mejor en el grupo que presenta una baja expresión de CD81 (30.4% frente a 28%).

En el grupo de baja expresión de CD81, un 47.7% de los casos presentaron metilación de MGMT frente a un 30.8% en el de alta. Con respecto al tratamiento, un 63.9% de los casos con baja expresión se pudieron someter a un tratamiento con temozolamida + radioterapia mientras que sólo un 44.4% de los pacientes con alta expresión fueron candidatos.

También se identificó una distribución diferente del subtipo molecular según grupos de expresión de CD81 (*tabla 3*). Se evidenció una mayor proporción de subtipos mesenquimal y neural en el grupo con mayor expresión de CD81 (38.9 vs. 20.8% y 25.0 vs. 13.9%;  $p=0.007$ ). En el caso contrario, los subtipos clásico y proneural estuvieron más presentes en el subgrupo con menor expresión de CD81. Las diferencias principales entre subtipos moleculares se confirmaron con posteriores análisis (*Figura 3*; *Kruskal-Wallis*;  $p=0.004$ ).



**FIGURA 3: Expresión de CD81 en cada subgrupo molecular.** Se encontraron diferencias estadísticas significativas tras el uso de Kruskal-Wallis ( $p=0.004$ ), con el test de Dunn para múltiples comparaciones (\*:  $p<0.05$  en el test de Dunn)

También fue identificado un número mayor de mutaciones en pacientes con bajo CD81 (72.18 vs. 46.29;  $p=0.047$ ) (*tabla 2*). Se analizó la carga mutacional de los pacientes seleccionados. Las mutaciones driver más frecuentes entre los genes seleccionados en la cohorte de pacientes del TCGA afectaron a PTEN, TP53 y EGFR (*tabla suplementaria*

3). Las diferencias en la incidencia de mutaciones entre los 2 grupos de ARN de CD81 están registradas en la *tabla suplementaria 5*.

Se describió una mayor incidencia de las mutaciones driver en TP53 en pacientes con baja expresión de CD81 (38.9 vs. 18.1%, p-no corregida=0.015), pero esta diferencia no fue significativa con los valores corregidos con FDR (FDR>0.1) (*tabla suplementaria 5*). No se encontraron otras diferencias significativas en este análisis.

También fue realizado un análisis del número de copias del ARN. Se analizaron amplificaciones y deleciones focales en los 10 genes más relacionados con las CNVs focales mostraron una mayor incidencia en PTEN (16.7 vs. 4.2%; p-no corregida=0.026), pero no fue significativa cuando se consideró a corrección por FDR (FDR>0.1) (*tabla suplementaria 4*).

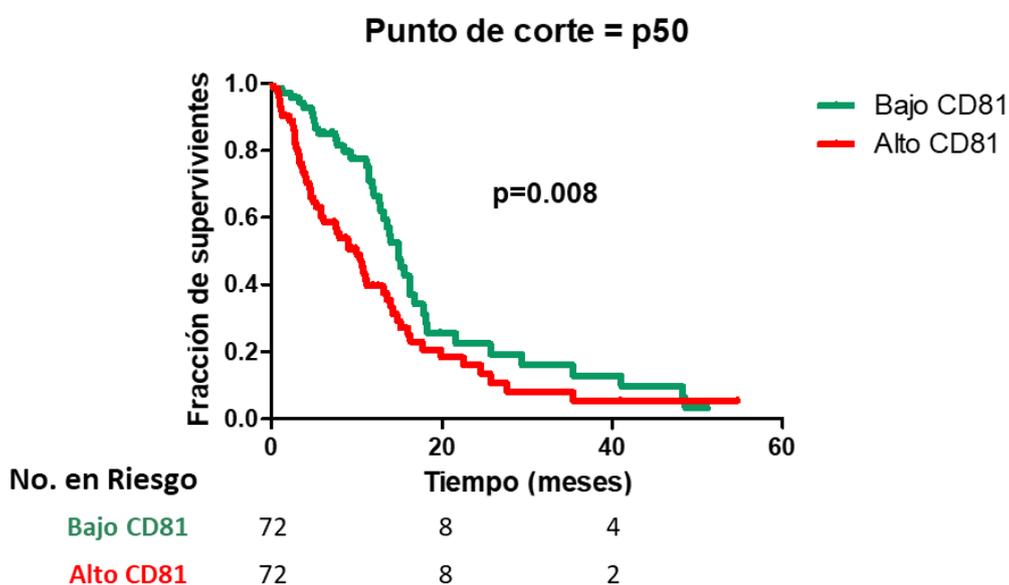
Finalmente, acorde al análisis de regresión, los pacientes con alta expresión de CD81 presentaron una supervivencia global mediana de 10.0 meses (95% C.I. [11.1 – 15.2]) mientras que los pacientes con baja expresión de CD81 mostraron una mediana de supervivencia global de 14.9 meses (95% C.I. [12.8 – 17.0]). Esta diferencia consigue una significación estadística (Log-Rank test; p=0.008) (figura 4, tabla 2).

**TABLA 2: Análisis comparativo de las características clínicas y moleculares entre la baja ( $\leq p50$ ) y alta ( $> p50$ ) expresión del ARN de CD81.**

		CD81 bajo (n=72)	CD81 alto (n=72)	p-valor
Edad (años)		60.01 (SD=12.98)	61.0 (SD=12.81)	0.316 <sup>1</sup>
Sexo (femenino: masculino)		25:46	25:47	1.000 <sup>2</sup>
Karnofsky < 80		17 (30.4 %)	14 (28.0 %)	0.833 <sup>2</sup>
Subtipo molecular				
	Clásico	27 (37.5 %)	15 (20.8 %)	<b>0.007<sup>3</sup></b>
	Mesenquimal	15 (20.8 %)	28 (38.9 %)	
	Proneural	20 (27.8 %)	11 (15.3 %)	
	Neural	10 (13.9 %)	18 (25.0 %)	

Metilación MGMT		31 (47.7 %)	16 (30.8 %)	0.087 <sup>2</sup>
Fracción del genoma alterado		0.24 (SD=0.14)	0.19 (SD=0.11)	0.177 <sup>1</sup>
Aneuploidías		10.30 (SD=15.2)	9.73 (SD=9.07)	0.430 <sup>1</sup>
Mutaciones		72.18 (SD=128.9)	46.29 (19.2)	<b>0.047<sup>1</sup></b>
Supervivencia total (meses)		14.9 [12.8 – 17.0]	10.0 [11.1 – 15.2]	<b>0.008<sup>4</sup></b>

L EYENDA: (1) U de Mann-Whitney / (2) Test de Fisher / (3) Chi-cuadrado / (4) Test de Log Rank



**FIGURA 4:** Curvas de Kaplan-Meier de alta y baja expresión del ARN de CD81 en la supervivencia total

### **EXPRESIÓN Y EVALUACIÓN PRONÓSTICA DE hsa-miR-582-5p: UN miRNA DIRIGIDO A CD81**

De acuerdo con los resultados descritos anteriormente y teniendo en cuenta la regulación de la expresión de CD81 mediante diferentes microARNs, se realizó un análisis usando la expresión de hsa-miR-582-5p. Este microARN fue seleccionado ya que se modula la expresión de CD81 y se ha descrito que juega un papel en la patogénesis de los gliomas.

La supervivencia global de pacientes con baja o alta expresión de CD81 fue influenciada por el nivel de expresión de hsa-miR-582-5p. Pacientes con alta expresión de CD81 y baja expresión de hsa-miR-582-5p presentaron una mediana de OS de 5.8 meses mientras aquellos con alta expresión de CD81 en el grupo de alta expresión de hsa-miR-582-5p presentaron una supervivencia global mediana de 10.8 meses.

Aún así, la diferencia no fue estadísticamente significativa (Log-Rank test;  $p=0.517$ ) (figura 5). No se encontró diferencia OS en pacientes con baja expresión de CD ya que se modula la expresión de CD81 y se ha descrito que juega un papel en la patogénesis de los gliomas entre subgrupos de baja expresión de hsa-miR-582-5p (15.1 vs. 12.8;  $p=0.894$ ) (figura 5).

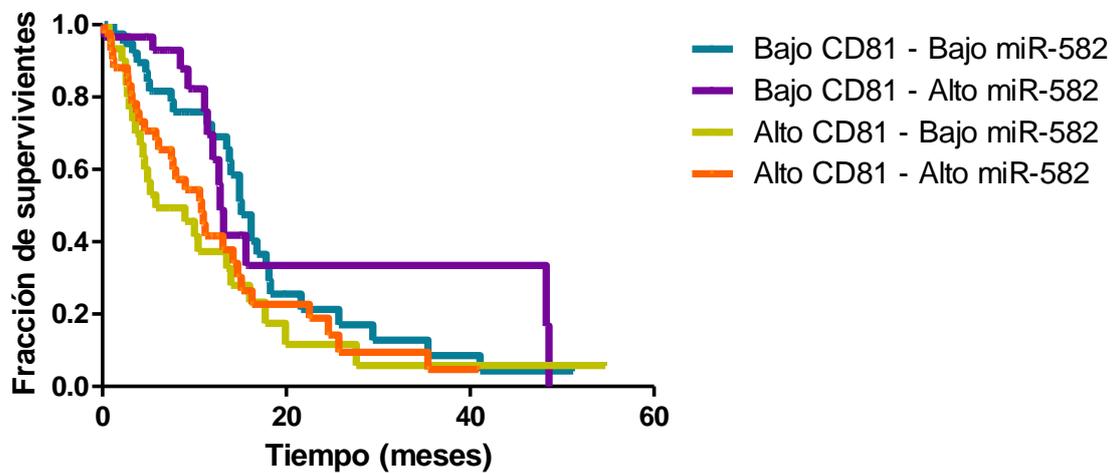


FIGURA 5: Curvas de Kaplan-Meier de alta y baja expresión de CD81 estratificadas según expresión de hsa-miR-582.

## DISCUSIÓN

En este trabajo hemos hecho un análisis de los pacientes diagnosticados de glioblastoma incluidos en la base de datos del TCGA, estratificando sus datos según la expresión de CD81. Los resultados obtenidos han resultado de interés ya que se ha visto que el grupo con mayor expresión de CD81 presentó una supervivencia total de 300 días (intervalo de confianza 208.24-391.76), siendo sustancialmente inferior la del grupo con menor expresión de esta, 448 días (intervalo de confianza 385.71-510.29).

Otro dato relevante es que se encontró distinta distribución de los subtipos moleculares en las categorías de expresión de CD81: El subtipo dominante en GBM con mayor expresión de CD81 fue el mesenquimal (el de peor pronóstico; que presenta delección 17q11.2, región que codifica el gen NF1, así como marcadores mesenquimales) y en el de baja expresión, el clásico, que se caracteriza por una amplificación del cromosoma 7 y pérdida del cromosoma 10. <sup>(21)</sup>

En lo que respecta a los genes que con más frecuencia se encuentran mutados en este cáncer, destacó TP53, conocido supresor tumoral que juega un papel fundamental en la regulación del ciclo celular o en la apoptosis de células dañadas, entre otros procesos, siendo el gen con más frecuencia mutado en los cánceres humanos, presentó mutaciones driver sin sentido en 23 casos del grupo de baja expresión (31.9%) vs. 9 (12.5%) del de alta expresión; con lo que concluimos que la oncogénesis en el grupo de menor expresión está más relacionada con un proceso ampliamente estudiado (mutación del gen TP53) que en el de mayor expresión, que requiere mayor estudio. En el caso del glioblastoma, la vía p-53-ARF-MDM2 está regulada a la baja en un 84% de los pacientes y en un 94% de las líneas celulares. Las mutaciones en este gen normalmente suponen una ganancia de función de las variantes más oncogénicas de esta proteína y se relaciona con un peor pronóstico, además de con una posible resistencia al tratamiento quimioterápico al incrementar la expresión de MGMT. <sup>(18, 32)</sup>

Esto supone una contradicción ya que, como habíamos dicho, la alta expresión de CD81 se relaciona con un peor pronóstico, pero también la mutación de TP53. Eso nos hace pensar que la mayor agresividad de los tumores que presentan más CD81 se puede deber a otros procesos, entre los que destacamos la capacidad migratoria de las células con más cantidad de CD81. Esta capacidad migratoria no ha sido estudiada en el glioblastoma, pero sí se ha visto en otros tipo de neoplasia, como la de mama, donde se observó que,

además de que la expresión de CD81 era superior en células tumorales frente a células normales, ésta se relacionaba con una mayor capacidad metastásica, un peor estadio clínico y una supervivencia reducida <sup>(7)</sup> o el osteosarcoma, donde se observó que la células presentaban menos proliferación, migración e invasión tras la inhibición de CD81. <sup>(20)</sup>

Por todo esto, se concluye que una alta expresión de CD81 es un factor de mal pronóstico en el glioblastoma, siendo la primera vez que esto es descrito en el caso de este tumor, aunque bien es cierto que este potencial patógeno había sido descrito con anterioridad en el caso de tumores colorrectales <sup>(19)</sup>, prostáticos <sup>(27)</sup> o melanomas <sup>(12)</sup>.

En el caso de los tumores de próstata, se concluyó que una mayor expresión de CD81 se relacionaba con un mayor estadio TNM (65.3% de los casos con mayor expresión eran de estadio 3-4, frente a sólo un 34.6% de los casos con menor expresión) <sup>(27)</sup>. En el caso de los melanomas, se ha demostrado que una sobreexpresión de esta proteína tiene una íntima relación con una mayor migración, invasión y metástasis por parte de las células tumorales. <sup>(12)</sup> Por contra, existen tumores donde se ha demostrado que el mal pronóstico se corresponde con una menor expresión de CD81, como en el caso de los tumores pancreáticos <sup>(19)</sup> o los carcinomas hepáticos, donde se ha visto que las células que presentan expresión menor de CD81 tienen mayor potencial metastásico <sup>(12)</sup>.

Es difícil indicar una única razón por la que CD81 pueda ser causante del mal pronóstico del glioblastoma, sobre todo debido a que es una tetraspanina expresada en la mayoría de los tejidos corporales y que se ha visto que está implicada en gran cantidad de procesos celulares, pero podría estar relacionado con el hecho de que las tetraspaninas se agrupan formando complejos transductores de señales llamados TEMs (*tetraspanin enriched microdomains* – dominios enriquecidos en tetraspaninas), en los cuales su función en la comunicación intercelular, regulación, migración etc, se amplifica, siendo todas ellas funciones muy relevantes en la génesis y progresión tumoral. <sup>(29)</sup>

Otro motivo puede ser que, en el glioblastoma, EWI-2, una proteína de superficie celular que se cree que tiene un papel fundamental en la inhibición tumoral y en el aumento de la esperanza de vida, se encuentra disminuida <sup>(29)</sup>. La distinta expresión de EWI-2 afecta marcadamente la organización de 4 proteínas, entre las que se incluye CD81 (CD9, MMP-2, MT1-MMP y CD81), haciendo que, por ejemplo, CD81 y CD9 se asocien más entre sí; y que CD81 y otras tetraspaninas tengan menos relación con MMP-2 y MT1-MMP. Así, se concluye que esta reorganización molecular puede afectar ampliamente a la

proliferación y/o migración de células tanto en los astrocitomas como en los glioblastomas <sup>(23)</sup>.

Otra hipótesis plausible tiene que ver con la función que ejerce CD81 en el sistema inmune en relación con distintos cánceres. Vences-Catalán et al. (2016) realizaron un estudio donde se implantaron células tumorales de varios tipos en ratones deficientes en CD81 y ratones WT (*wild type*), y se observó cómo en los ratones WT el crecimiento de los tumores primarios era más rápido y había una mayor prevalencia de metástasis pulmonares, ya que éstos reclutaban a linfocitos T reguladores y células mieloides supresoras tumorales, que producían IL-10, que inhibe a los Teff o efectores T antitumorales, con lo que se concluyó que el nivel de expresión de CD81 en el paciente es determinante de la posterior progresión tumoral <sup>(30)</sup>.

Esta implicación del sistema inmune tanto en la génesis como en la progresión tumoral, unida a los problemas que presenta la terapia sistémica en el glioblastoma por factores como la protección de las células tumorales mediante la barrera hematoencefálica o la resistencia intrínseca de éstas a la apoptosis, hacen cada vez más interesante el estudio de la inmunoterapia. Por ejemplo, se ha visto como el uso de DCVax-L incrementó la mediana de supervivencia de estos pacientes en unos 3 años o que la vacuna Prophage G100 ha demostrado resultados positivos en la fase II de su estudio. Aún así, el estudio de este campo sigue en proceso y ninguna medida terapéutica ha demostrado ser eficaz. <sup>(13, 17)</sup>

De igual manera, nuestro estudio tiene notables limitaciones ya que no tenemos datos sobre la expresión de la proteína CD81, sino su expresión a nivel de microARN. Asimismo, el análisis del perfil de expresión de microARN analizado sólo ha incluido uno de ellos, debido a los criterios que hemos empleado para su selección. Resulta razonable pensar que deben existir otros microARN que modulen la expresión de CD81 pero que aún no han sido estudiados en gliomas.

Por todo ello, resultan necesarios nuevos estudios que permitan analizar, determinando el nivel de expresión de CD81 a nivel de proteína, el papel real que puede jugar esta molécula de superficie en el pronóstico del glioblastoma. Asimismo, convendría realizar estudios funcionales in vitro en cultivos celulares específicos de glioblastoma para analizar sus capacidades oncogénicas. En estos estudios, además, convendría analizar el papel que pueden jugar algunos microRNA que modulan CD81.

## CONCLUSIONES

Tras realizar este estudio, se concluye que, después de analizar la cohorte de pacientes diagnosticados de glioblastoma del TCGA, este tipo de tumor sobre expresa CD81, que se ha determinado que es un factor de mal pronóstico en este tumor.

La distinta expresión de esta proteína está íntimamente ligada al subtipo molecular de los glioblastomas a estudio, viendo que la mayor expresión de CD81 se da mayormente en el subtipo mesenquimal, que es el de peor pronóstico, además de distintas características de amplificaciones, deleciones y mutaciones en los distintos genes.

Por último, también se estudiaron los niveles de hsa-miR-582-5p, un microARN que modula la expresión CD81 en el GBM, tras lo que se observó que en el grupo de mayor expresión de CD81, la supervivencia era mayor en los que presentaban menos expresión de este microARN, sin que se encontraran diferencias significativas en el grupo de baja expresión.

## **¿QUÉ HE APRENDIDO DURANTE ESTE TFG?**

En lo que respecta al TFG:

- Seguir las fases del método científico para así seleccionar artículos con información médica y biológica relevante y actual para mi estudio; fundamentando las posteriores investigaciones en base a ello.
- Usar y analizar bases de datos y sacar conclusiones teniendo en cuenta los resultados obtenidos.
- Elaborar y redactar la memoria de un trabajo de fin de grado, sintetizando las conclusiones más relevantes, e introducirme en el mundo de las investigaciones científicas.

En cuanto a la temática, he profundizado en el conocimiento de la patogénesis del glioblastoma, uno de los tumores con un pronóstico más pobre; y he visto cómo es posible investigar distintas moléculas y procesos en nuestro organismo para mejorar el curso natural de enfermedades o afecciones que ahora mismo consideramos fatales, con el fin de mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-sloan JS, et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. 2014.
- (2) Stupp R, Brada M, Pentheroudakis G. clinical practice guidelines High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines clinical practice guidelines. 2014;25 (December 2004).
- (3) Ludwig K, Kornblum HI. Molecular markers in glioma. J Neurooncol. 2017;0(0):0.
- (4) Kleihues P, Ohgaki H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. Toxicol Pathol 2000; 28:164–70.
- (5) Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. Lancet Oncol. 2014;15(9):395–403.
- (6) Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ, and the ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. Lancet Oncol 2006; 7: 392–401.
- (7) Zhang N, Zuo L, Zheng H, Li G, Hu X. Increased expression of CD81 in breast cancer tissue is associated with reduced patient prognosis and increased cell migration and proliferation in MDA-MB-231 and MDA-MB-435s human breast cancer cell lines in vitro. Med Sci Monit. 2018;24:5739–47.
- (8) Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, Van Den Bent MJ, Marosi C, et al. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and

- outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol.* 2012;124(4):547–60.
- (9) Brennan CW, Verhaak RGW, Mckenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, et al. Resource The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. 2013;462–77.
  - (10) Andria ML, Hsieh CL, Oren R, Francke U, Levy S (August 1991). "Genomic organization and chromosomal localization of the TAPA-1 gene". *Journal of Immunology.* 147 (3): 1030–6. PMID 1650385.
  - (11) Zhang X, Zhang Y. Bladder Cancer and Genetic Mutations. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2015 [Internet]. Volume 73, Issue 1, pp 65–69
  - (12) Vences-catalán F, Duault C, Kuo C, Rajapaksa R, Levy R, Levy S. CD81 as a tumor target. *Biochemical Society Transactions* [Internet]. 2017;(December 2016):531–5.
  - (13) Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2014;6(11):1359–70.
  - (14) Ahir BK, Ozer H, Engelhard HH, Lakka SS. MicroRNAs in glioblastoma pathogenesis and therapy: A comprehensive review. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2017;120(May):22–33.
  - (15) Luo JW, Wang X, Yang Y, Mao Q. Role of micro-RNA (miRNA) in pathogenesis of Glioblastoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2015;1630–9.
  - (16) Huang SW, Ali ND, Zhong L, Shi J. MicroRNAs as biomarkers for human glioblastoma: progress and potential. *Acta Pharmacologica Sinica* [Internet]. 2018; 39: 1405–1413.

- (17) Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2018;15(July).
- (18) Wang X, Chen JX, Liu JP, You C, Liu YH, Mao Q. Gain of function of mutant TP53 in glioblastoma: Prognosis and response to temozolomide. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(4):1337–44.
- (19) CD81 protein expression summary - The Human Protein Atlas. Disponible en: <https://www.proteinatlas.org/>
- (20) Mizoshiri N, Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mori Y, Hayashi D, et al. The tetraspanin CD81 mediates the growth and metastases of human osteosarcoma. *Cell Oncol*. 2019;42(6):861–71.
- (21) Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* [Internet]. 2010;17(1):98–110.
- (22) Paul Y, Mondal B, Patil V, Somasundaram K. DNA methylation signatures for 2016 WHO classification subtypes of diffuse gliomas. 2017;(April).
- (23) Kolesnikova T V., Kazarov AR, Lemieux ME, Lafleur MA, Kesari S, Kung AL, et al. Glioblastoma inhibition by cell surface immunoglobulin protein EWI-2, in vitro and in vivo. *Neoplasia*. 2009;11(1):77–86.
- (24) Malla RR, Pandrangi S, Kumari S, Gavara MM, Badana AK. Exosomal tetraspanins as regulators of cancer progression and metastasis and novel diagnostic markers. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018;14(6):383–91.
- (25) Ovalle S, Gutiérrez-López MD, Monjas A, Cabañas C. Implication of the tetraspanin CD9 in the immune system and cancer. *Inmunologia*. 2007;26(2):65–72.

- (26) Vences-Catalán F, Rajapaksa R, Srivastava MK, Marabelle A, Kuo CC, Levy R, et al. Tetraspanin CD81 promotes tumor growth and metastasis by modulating the functions of T regulatory and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2015;75(21):4517–26.
- (27) Zhang Y, Qian H, Xu A, Yang G. Increased expression of CD81 is associated with poor prognosis of prostate cancer and increases the progression of prostate cancer cells *in vitro*. *Exp Ther Med.* 2019;(January 2013):755–61.
- (28) Zona L, Tawar RG, Zeisel MB, Xiao F, Schuster C, Lupberger J, et al. CD81-receptor associations - Impact for hepatitis C virus entry and antiviral therapies. *Viruses.* 2014;6(2):875–92.
- (29) Hemler ME. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(1):49–60.
- (30) Vences-catalán F, Rajapaksa R, Srivastava MK, Marabelle A, Kuo C, Levy R, et al. Tetraspanin CD81, a modulator of immune suppression in cancer and metastasis. 2016;5(5).
- (31) Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):157-173. doi:10.1016/j.ccr.2006.02.019.
- (32) Zhang Y, Dube C, Gibert M, Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, et al. The p53 pathway in glioblastoma. *Cancers (Basel).* 2018;10(9).

## ANEXO 1: CLASIFICACIONES MÁS USADAS EN EL GLIOBLASTOMA

Según forma de aparición		Según subtipo molecular
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Primario</li> <li>● Secundario</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>● Proneural</li> <li>● Neural</li> <li>● Clásico</li> <li>● Mesenquimal</li> </ul>
Características de cada subtipo <sup>(22)</sup>		
IDH no mutado o GBM primario	IDH mutado o GBM secundario	
EGFR = PTEN = Promotor TERT ↓ ↓ Mutación TP53 ATRX =	EGFR ↑ PTEN ↓ Promotor TERT = ↑ Mutación TP53 Pérdida ATRX	

LEYENDA = ↑: amplificación / ↓: delección / =: *wildtype*

## ANEXO 2: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y MOLECULARES DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Características clínicas y moleculares de los pacientes del estudio		
		Pacientes del TCGA (n=144)
Edad		61.01 (SD=12.5)
Sexo (femenino:masculino)		50:93
Karnofsky < 80		31 (29.2%)
Metilación de MGMT		47 (32.6%)
Subtipo molecular		
	Clásico	42 (29.2%)
	Mesenquimal	43 (29.9%)
	Proneural	31 (21.5%)
	Neural	28 (19.4%)
Fracción del genoma alterado		0.21 (SD=0.13)
Aneuploidías		10.02 (SD=12.64)
Mutaciones		59.24 (SD=92.8)
Expresión de CD81 (RPKM)		18930.79 (SD=5552.3)
Supervivencia total (meses)		13.13 (95% CI: 11.0-15.2)
Tratamiento (TMZ+RT)		78 (54.2%)

LEYENDA = SD: Desviación estándar / MGMT: O<sup>6</sup> Metilguanina-ADN metiltransferasa / RPKM: Lecturas por millón de kilobases / TMZ: Temozolamida / RT: Radioterapia

**ANEXO 3: LISTA DE MICRORNAs QUE TIENEN COMO DIANA CD81 SEGÚN LAS BASES DE DATOS mirDB Y mirANDA**

hsa-miR-6126	hsa-miR-6750-5p	hsa-miR-548as-5p
hsa-miR-605-3p	hsa-miR-4690-3p	hsa-miR-548w
hsa-miR-6771-3p	hsa-miR-548au-5p	hsa-miR-548ab
hsa-miR-6768-5p	hsa-miR-548y	hsa-miR-548o-5p
hsa-miR-8070	hsa-miR-548ar-5p	hsa-miR-548ay-5p
hsa-miR-6868-3p	hsa-miR-559	hsa-miR-548c-5p
hsa-miR-1248	hsa-miR-548ae-5p	hsa-miR-320a-5p
hsa-miR-5000-5p	hsa-miR-548am-5p	hsa-miR-6805-5p
hsa-miR-4493	hsa-miR-548aq-5p	hsa-miR-10398-5p
<b>hsa-miR-582-5p</b>	hsa-miR-548j-5p	hsa-miR-548n
hsa-miR-7976	hsa-miR-548ak	hsa-miR-4486
hsa-miR-4789-5p	hsa-miR-548bb-5p	hsa-miR-548ag
hsa-miR-589-3p	hsa-miR-4761-5p	hsa-miR-548ai
hsa-miR-6779-3p	hsa-miR-548ap-5p	hsa-miR-548ba
hsa-miR-548m	hsa-miR-548a-5p	hsa-miR-570-5p
hsa-miR-4477a	hsa-miR-548b-5p	hsa-miR-194
hsa-miR-10399-5p	hsa-miR-548ad-5p	hsa-miR-29b
hsa-miR-190a-3p	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-433
hsa-miR-6504-3p	hsa-miR-548h-5p	hsa-miR-29 <sup>a</sup>
hsa-miR-4672	hsa-miR-1237-3p	hsa-miR-29c
hsa-miR-5685	hsa-miR-548i	

LEYENDA: Los microARNs coloreados tienen potencial en la patogénesis del Glioblastoma según Ahir BK et al. (2017). Rojo: Oncogénico / Verde: Supresor tumoral

**ANEXO 4: ANÁLISIS GISTIC DE LAS 10 AMPLIFICACIONES Y DELECCIONES MÁS COMUNES EN EL CÁNCER EN GRUPOS DE ALTA Y BAJA EXPRESIÓN DEL ARN DE CD81**

		Expresión del ARN de CD81				p-valor	FDR
		Baja		Alta			
		Conteo	%	Conteo	%		
<b>CDKN2A</b>	Deleción profunda	37	51.4%	41	56.9%	0.616	0.77
	Amplificación	0	0.0%	0	0.0%		
	Normal	35	52.8%	33	43.1%		
<b>CDKN2B</b>	Deleción profunda	34	47.2%	39	54.2%	0.505	0.721
	Amplificación	0	0.0%	0	0.0%		
	Normal	38	52.8%	33	45.8%		
<b>MTAP</b>	Deleción profunda	33	45.8%	39	54.2%	0.405	0.675
	Amplificación	0	0.0%	0	0.0%		
	Normal	39	54.2%	33	45.8%		
<b>EGFR</b>	Deleción profunda	0	0.0%	0	0.0%	1.000	1.000
	Amplificación	35	48.6%	36	50.0%		
	Normal	37	51.4%	36	50.0%		
<b>CDK4</b>	Deleción profunda	0	0.0%	0	0.0%	0.379	0.675
	Amplificación	15	20.8%	10	13.9%		
	Normal	57	79.2%	62	86.1%		
<b>MLLT3</b>	Deleción profunda	6	8.3%	8	11.1%	0.780	0.866
	Amplificación	0	0.0%	0	0.0%		
	Normal	66	91.7%	64	88.9%		
<b>FIPL1</b>	Deleción profunda	0	0.0%	0	0.0%	0.155	0.516

	Amplificación	14	19.4%	7	9.7%		
	Normal	58	80.6%	65	90.3%		
<b>PDGFRA</b>	Delección profunda	0	0.0%	0	0.0%	0.155	0.516
	Amplificación	14	19.4%	7	9.7%		
	Normal	58	80.6%	65	90.3%		
<b>CHIC2</b>	Delección profunda	0	0.0%	0	0.0%	0.325	0.675
	Amplificación	12	16.7%	7	9.7%		
	Normal	60	83.3%	65	90.3%		
<b>PTEN</b>	Delección profunda	3	4.2%	12	16.7%	<b>0.026</b>	0.26
	Amplificación	0	0.0%	0	0.0%		
	Normal	69	95.8%	60	83.3%		

**ANEXO 5: ESTADO MUTACIONAL DE LOS 10 GENES MÁS FRECUENTEMENTE MUTADOS EN GBM PARA GRUPOS DE ALTA Y BAJA EXPRESIÓN DE ARN DE CD81**

			Expresión del ARN de CD81					
			Baja		Alta			
			Conteo	%	Conteo	%	p-valor	FDR
<b>PTEN</b>	Driver	Sin sentido	8	11.1%	11	15.3%	0.599	0.748
		Truncadora	14	19.4%	11	15.3%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	Passenger	Sin sentido	1	1.4%	3	4.2%		
		Truncadora	0	0.0%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	No mutación			49	68.1%	47		
<b>TP53</b>	Driver	Sin sentido	23	31.9%	9	12.5%	<b>0.015</b>	0.15
		Truncadora	3	4.2%	4	5.6%		
		Inframe	2	2.8%	0	0.0%		
	Passenger	Sin sentido	0	0.0%	0	0.0%		
		Truncadora	0	0.0%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	No mutación			44	61.1%	59		
<b>EGFR</b>	Driver	Sin sentido	22	30.6%	17	23.6%	0.532	0.748
		Truncadora	0	0.0%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	Passenger	Sin sentido	4	5.6%	3	4.2%		
		Truncadora	1	1.4%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	No mutación			45	62.5%	51		
<b>PIK3R1</b>	Driver	Sin sentido	1	1.4%	1	1.4%	0.795	0.883
		Truncadora	2	2.8%	4	5.6%		
		Inframe	1	1.4%	0	0.0%		
	Passenger	Sin sentido	1	1.4%	1	1.4%		

	Passenger	Truncadora	0	0.0%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	No mutación		67	93.1%	66	91.7%		
<b>NF1</b>	Driver	Sin sentido	0	0.0%	0	0.0%	0.575	0.748
		Truncadora	6	8.3%	7	9.7%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	Passenger	Sin sentido	0	0.0%	1	1.4%		
		Truncadora	0	0.0%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
No mutación		66	91.7%	64	88.9%			
<b>PIK3CA</b>	Driver	Sin sentido	4	5.6%	3	4.2%	0.534	0.748
		Truncadora	0	0.0%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	Passenger	Sin sentido	1	1.4%	0	0.0%		
		Truncadora	0	0.0%	1	1.4%		
		Inframe	0	0.0%	1	1.4%		
No mutación		67	93.1%	67	93.1%			
<b>PCLO</b>	Driver	Sin sentido	0	0.0%	0	0.0%	0.340	0.748
		Truncadora	0	0.0%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	Passenger	Sin sentido	5	6.9%	6	8.3%		
		Truncadora	0	0.0%	2	2.8%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
No mutación		67	93.1%	64	88.9%			
<b>RB1</b>	Driver	Sin sentido	1	1.4%	0	0.0%	0.495	0.748
		Truncadora	4	5.6%	6	8.3%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	Passenger	Sin sentido	0	0.0%	0	0.0%		
		Truncadora	0	0.0%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
No mutación		67	93.1%	66	91.7%			
<b>ATRX</b>	Driver	Sin sentido	0	0.0%	0	0.0%	0.363	0.748
		Truncadora	1	1.4%	0	0.0%		

		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	Passenger	Sin sentido	1	1.4%	0	0.0%		
		Truncadora	0	0.0%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	No mutación		70	97.2%	72	100.0%		
<b>KEL</b>	Driver	Sin sentido	0	0.0%	0	0.0%	1.000	1.000
		Truncadora	0	0.0%	0	0.0%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	Passenger	Sin sentido	4	5.6%	4	5.6%		
		Truncadora	1	1.4%	1	1.4%		
		Inframe	0	0.0%	0	0.0%		
	No mutación		67	93.1%	67	93.1%		