

Biomarcadores en gliomas de alto grado: revisión sistemática

Salvador Manrique-Guzmán*

Departamento de Neurocirugía, Centro Médico ABC Observatorio, México, D.F., México

Resumen

Antecedentes: Un biomarcador forma parte de una subcategoría de signos médicos que pueden ser medidos y reproducidos con precisión, y tienen la capacidad potencial de predecir un desenlace. Los procesos biológicos están conformados por tejidos, células o fluidos. El uso potencial de un biomarcador consiste en la capacidad de identificar la predisposición a cierta enfermedad tomando en cuenta la variabilidad y validez. La sistematización de los procesos puede reducir los costos operativos. Actualmente se han descrito cuatro biomarcadores para los gliomas de alto grado: delección 1p/19q, metilación del sitio promotor de O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), mutación isocitrato deshidrogenasa 1/isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH1/IDH2) y micro-ARN. En este trabajo se realiza una revisión sistemática de la información de acuerdo al protocolo MOOSE para asentar las bases de la utilidad de los biomarcadores en los gliomas de alto grado. **Material y métodos:** Se trata de una revisión sistemática de la literatura de acuerdo a los lineamientos PRISMA y la guía MOOSE. Se incluyeron todos los artículos publicados en PubMed, Embase y Ovid de enero de 2004 a noviembre de 2014 con las palabras clave biological markers y glioblastoma que mostraran dentro de su resultados razón de momios (OR) e intervalo de confianza (IC) al 95%. La extracción de la información fue realizada por un solo investigador. **Resultados:** Se encontró un total de 169 años de tres buscadores médicos. En PubMed se encontraron 42 artículos, en Embase, 30 y en Ovid, 96. **Conclusiones:** Los biomarcadores son herramientas prometedoras para la detección temprana de enfermedades como el glioma de alto grado, así como para la respuesta al tratamiento. Sin embargo, la falta de estandarización en los procesos metodológicos ha retrasado su avance y la replicación de los ensayos clínicos para la obtener la validez clínica que permita establecer una predicción certera del desenlace de los pacientes con cáncer, particularmente, con gliomas de alto grado.

PALABRAS CLAVE: Biomarcador. Glioblastoma. Glioma de alto grado.

Abstract

Background: Biomarkers are a subcategory of clinical signs that can be measured and reproduced with precision and influence to predict outcome. Tissue, cells, and fluid conform the biological process. Biomarker usefulness is to determine and specify illness predisposition counting with variability and validity. Process systematization can reduce operative costs. To date, four major biomarkers have been described for high-grade gliomas: 1p/19q deletion, O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter mutation, IDH1/IDH2 mutation, and microRNA. In this manuscript we present a systematic review according to the MOOSE protocol to establish the bases to describe the utility of biomarkers in high-grade tumors. **Materials and methods:** We conducted a systematic review of the literature according to the PRISMA and MOOSE guides of all the published data from January 2004 to November 2014 with the key words: "biological markers" and "glioblastoma" that included

Correspondencia:

*Salvador Manrique-Guzmán
Departamento de Neurocirugía
Centro Médico ABC Observatorio
Sur, 136, 116, consultorio 2-B
Col. Las Américas, C.P. 01120, México, D.F., México
E-mail: manriquemd@yahoo.com

Fecha de recepción en versión modificada: 20-01-2015

Fecha de aceptación: 19-03-2015

OR and 95% CI. One researcher performed data extraction and analysis. **Results:** A total of 169 articles were found in three major medical search engines: PubMed (42), Embase (30) and Ovid (96). **Conclusion:** Biomarkers are tools designed for early detection of specific illnesses such as high-grade glioma. Lack of methodological standardization slows down the speed of progress. (Gac Med Mex. 2016;152:87-93)

Corresponding author: Salvador Manrique-Guzmán, manriquemd@yahoo.com

KEY WORDS: Biomarkers. Glioblastoma. High-grade tumor.

Introducción

Un biomarcador se define como una subcategoría de signos médicos que pueden ser medidos y reproducidos con precisión. En conjunto, son características objetivamente medidas y evaluadas como un indicador de procesos biológicos normales, de eventos patógenos y de respuesta farmacológica al tratamiento establecido. La Organización Mundial de la Salud (OMS) los define como cualquier sustancia, estructura o proceso dentro del cuerpo humano (o su producto) que puede ser medido y la influencia para predecir un desenlace¹.

El empleo de biomarcadores en la investigación básica y clínica se ha convertido en un eje primordial de los ensayos clínicos y algunos de ellos han sido aceptados como válidos. Los biomarcadores específicos se han caracterizado y de forma reiterada han mostrado proporcionar información predictiva sobre el desenlace de una variedad de tratamientos.

Por definición, los biomarcadores son instrumentos objetivos y cuantifican las características de los procesos biológicos como en tejidos, células o fluidos. Sin embargo, no necesariamente se correlacionan con la experiencia de bienestar o sensación del paciente. La ventaja que ofrece el empleo de biomarcadores como desenlaces subrogados es evidente en estudios de sobrevida, al mostrar al investigador evidencia sobre la eficacia y seguridad del tratamiento. De igual forma, permite a los investigadores reducir el número de sujetos de experimentación.

Para identificar biomarcadores de desenlace subrogado se requiere determinar su relevancia y validez. La relevancia de un biomarcador se define como la habilidad de otorgar información clínica relevante de la pregunta de interés. La validez se refiere a la necesidad de establecer la efectividad de un biomarcador como un punto de desenlace².

En la práctica, los biomarcadores incluyen herramientas y tecnologías auxiliares para identificar la causa, diagnóstico, progresión, regresión y desenlace de una enfermedad¹.

En el sistema nervioso central existe una amplia variedad de técnicas para obtener información sobre el estado del cerebro, tanto sano como enfermo. La medición de medios biológicos puede ser directa (sangre, líquido cefalorraquídeo [LCR]) o indirecta a través de estudios de imagen que no requieren la obtención de un muestra biológica pero que pueden cambiar su composición¹.

Su uso en investigación se ha incrementado ante la necesidad de obtener sistemas directos de medición de la exposición ante una enfermedad con el menor sesgo posible y con potencial de proveer información sobre la exposición. Los biomarcadores moleculares brindan al médico clínico y al de investigación información suficiente para entender el espectro de las enfermedades neurológicas¹.

Clasificación de biomarcadores³

- Tipo 0: mide la historia natural de la enfermedad y debe correlacionarse con el tiempo de expresión de las manifestaciones clínicas.
- Tipo 1: tiene efecto en la intervención.
- Tipo 2: se trata de los marcadores de desenlace.

Exposiciones, modificadores y factores de riesgo

Cuando existe la sospecha de una enfermedad como consecuencia de la exposición, los investigadores analizan los factores de la exposición. La exposición externa se mide como la concentración de toxina en el ambiente inmediato del sujeto. Los cuestionarios identifican la exposición histórica, pero se requiere la medición directa (aire, agua, suelo, alimento) de la dosis, que brinda información más precisa. Cuando estas toxinas son identificadas en tejidos o fluidos, se convierten en biomarcadores. Un biomarcador que mide el efecto biológico de la dosis generalmente se relaciona con la cantidad de toxina o químico que se aloja en el órgano blanco¹.

Susceptibilidad genética

La influencia ambiental en la enfermedad puede ser analizada a través de estudios epidemiológicos. Las variantes en los alelos o polimorfismos pueden estar relacionadas, pero no son determinísticas. Este biomarcador existe antes de la enfermedad o el desenlace y es independiente de otras exposiciones¹.

Biomarcadores intermedios

Se relacionan fuertemente con la enfermedad a través de rutas que llevan a la causa. Pueden ser dependientes de otra causa no conocida y pueden estar relacionados con una exposición que ya ha sido identificada o representan una alteración causada por la exposición que conlleva la enfermedad¹.

Biomarcadores de la enfermedad

El uso potencial de estos biomarcadores abarca la capacidad de identificar a un individuo destinado a padecer cierta enfermedad o que está en su fase preclínica, así como de reducir la heterogeneidad de la enfermedad en ensayos clínicos o estudios epidemiológicos; reflejan la historia natural de la enfermedad incluyendo las fases de inducción, latencia y detección, y el objetivo en un ensayo clínico¹.

Variabilidad

Se presenta de forma individual e independiente si el biomarcador representa la exposición. La variabilidad interindividual es consecuencia de la cantidad de exposición externa o de la forma en la que las toxinas son metabolizadas. La variabilidad intraindividual se relaciona con errores de laboratorio u otras condiciones. También existe la variabilidad grupal, que habitualmente se busca como indicador pronóstico¹.

Validez

Debe ser considerada y medida como cualquier otra variable. Los errores de laboratorio pueden ocasionar errores en la clasificación e identificación de los agentes causales. Hay que realizar estudios pilotos para establecer una confiabilidad razonable. Se deben utilizar el grado de acuerdo a través de análisis κ para las variables binarias o dicotómicas y el coeficiente de correlación intraclase para evaluar el acuerdo de prueba-reprueba y consistencia¹.

En la evaluación de la validez de un biomarcador, que es compleja, deben contemplarse tres aspectos fundamentales:

- Contenido de validez: demuestra el grado de afectación de un biomarcador para reflejar el fenómeno biológico estudiado.
- Validez de constructo: representa otras características de la enfermedad; por ejemplo, otro biomarcador o manifestación de la enfermedad.
- Criterios de validez: demuestran la extensión de la correlación de un biomarcador con una enfermedad en particular; habitualmente esta validez se mide a través de la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos (positivo y negativo).

Consideraciones prácticas: errores de medición

Este tipo de errores disminuyen la validez hacia la enfermedad, y pueden ocurrir dentro y fuera del laboratorio. Pueden suceder durante la recolección del material o en el transporte de los especímenes hacia el laboratorio, repercutiendo en la medición del biomarcador; el almacenamiento incorrecto también puede afectar al resultado. La capacitación del personal es esencial. Un manual operativo de procedimientos con detalles precisos sobre el almacenamiento, la monitorización y el registro de mantenimiento puede favorecer la disminución de este tipo de errores^{1,4}.

Factores confusores

Son todos aquellos factores que alteran la medición de un biomarcador. Pueden ser internos (por ejemplo, el peso del paciente) o externos (por ejemplo, el material del laboratorio empleado). Las propiedades individuales de los biomarcadores deben influir en la interpretación para que sean incluidos en la investigación. La estabilidad biológica es de particular importancia si se pretende preservar por largo tiempo a un biomarcador. El almacenamiento de tejidos o material genético extraído es costoso, y se debe evaluar el intervalo de tiempo que se requerirá almacenar¹.

Costos

Los costos deben formar parte de las decisiones en la investigación de biomarcadores. En ensayos clínicos con una muestra pequeña quizá no sean representativos, pero en un estudio epidemiológico con un gran reclutamiento de pacientes se pueden alcanzar

costos elevados, a menos que el laboratorio cuente ya con un sistema automatizado que incluso puede reducir el costo por volumen¹.

Tejidos y fluidos candidatos para ser biomarcadores

Casi cualquier muestra de tejido o fluido corporal es un buen candidato para ser un biomarcador. En algunas pruebas específicas, como la metilación del ADN, pueden estudiarse a partir de bloques de parafina. Para la extracción de ARN el proceso de conservación requiere mayor cuidado. En la mayoría de tumores primarios la información se obtiene a partir de una biopsia, pero para la detección temprana del cáncer y otras enfermedades no transmisibles se puede obtener a través de fluidos corporales como la sangre venosa periférica, el epitelio de la cavidad oral o la saliva, la orina, las heces fecales, el aspirado bronquial y, en algunos casos, el músculo y el tejido adiposo^{5,6}.

La revisión sistemática y los metaanálisis son herramientas útiles para resumir la evidencia actual sobre un pregunta de investigación con el fin de mejorar su utilidad en el área de investigación. Deben ser presentados de una forma clara y veraz⁷. Por tal motivo, este trabajo pretende recaudar la información necesaria para sentar la base de la búsqueda de biomarcadores para los tumores primarios de cerebro, que representan el tumor primario más común del sistema nervioso central. Se estima que la supervivencia no se extiende a más de tres años, con un promedio de 18 meses⁸. Afectan a cerca de 20,000 pacientes de EE.UU. cada año⁹.

Biomarcadores en gliomas de alto grado

Mutación IDH1/IDH2

La secuenciación de los gliomas de alto grado ha identificado mutaciones en los genes que codifican la IDH1 y la IDH2. La mutación en IDH es específica de los gliomas de alto grado; la mutación IDH2 se ha encontrado en la leucemia mieloide aguda. Se ha correlacionado la mutación con la fase temprana de gliomagénesis¹⁰. Dicha mutación en IDH1 se encuentra en el 80% de los gliomas de grados II y III de acuerdo a la clasificación de la OMS y en el 10% de los glioblastomas primarios. La mutación en IDH2 se ha descrito en los gliomas, pero con menor frecuencia^{10,11}.

1p/19q

La pérdida en la heterocigosidad por la translocación del centrómero en el cromosoma 1p/19q se ha identificado como un marcador atípico para los tumores primarios del sistema nervioso central, con una frecuencia del 80% para los gliomas de bajo grado, del 60% para los oligodendrogliomas anaplásicos, del 30-50% para los oligoastrocitomas, del 30% para los oligoastrocitomas anaplásicos y del 10% para los gliomas de alto grado¹⁰.

Metilación del sitio promotor MGMT

El gen *MGMT* codifica una proteína reparadora del ADN removiendo el grupo alquilante de la posición O6 de la guanina a causa del tratamiento de quimioterapia alquilante, como la temozolamida¹²⁻¹⁴. El proceso para identificar el estado de metilación se lleva a cabo a través de PCR específica de metilación mediante la conversión bisulfito (conversión no metilada a uracilo)^{8,15,16}. La *MGMT* es una enzima reparadora que remueve el agente alquilante de la posición O6 de la guanina, que ocasiona un mal apareamiento durante la replicación celular, induciendo su apoptosis, que conlleva una mayor supervivencia¹⁷.

Micro-ARN

Son porciones cortas no codificantes de ARN (19-24 nucleótidos) que regulan la expresión de un gen de forma postranscripcional. Funcionan como reguladores clave de múltiples procesos biológicos, como la proliferación celular, la diferenciación celular y la apoptosis. Pueden funcionar como supresores tumorales u oncogenes^{6,8,14,16,18-21}.

Material y métodos

Se trata de una revisión sistemática de la literatura de acuerdo a los lineamientos PRISMA propuestos por Liberati, et al., así como la guía MOOSE para análisis de revisión sistemática y metaanálisis^{22,23}.

Búsqueda primaria

Se incluyeron todos los artículos de revisión de relevancia publicados en inglés exclusivamente en PubMed, Medline y Embase, de enero de 2004 a noviembre de 2014, que contuvieran OR 95% e IC 95% con las siguientes palabras clave (MeSH): *biological*

Tabla 1. Descripción de los artículos empleados para la revisión

Autor (año)	Casos	País	Histología
Laxton, et al. (2013) ⁴⁰	288	Reino Unido	Glioblastoma multiforme
Collet, et al. (2011) ⁴¹	5	Francia	Glioblastoma multiforme
Medina Villaamil, et al. (2011) ⁴²	28	España	Glioma de alto grado Glioma de bajo grado
Yakut, et al. (2007) ⁴³	37	Turquía	Glioma de alto grado
Demirci, et al. (2012) ⁴⁴	44	Turquía	Glioma de alto grado
Jha, et al. (2010) ⁴⁵	101	India	Glioma de alto grado
Ma, et al. (2008) ⁴⁶	72	Alemania/China	Glioma de alto grado Glioma de bajo grado

markers y glioblastoma. Los artículos se limitaron a estudios en humanos y población adulta.

Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron todos aquellos artículos observacionales que identificaran biomarcadores con gliomas de alto grado, independientemente del tamaño de población, que tuvieran las siguientes características: OR 95% e IC 95%, que los estudios no estuvieran relacionados y, en el caso de artículos que se sobrepusieran en recursos de población, se eligió el artículo más reciente o el de mayor población.

Extracción de la información

Un solo investigador extrajo la información utilizando una hoja de evaluación estandarizada para calificar la calidad. En caso de discrepancia, se obtuvo por consenso a través de un segundo investigador independiente. De cada artículo se extrajo lo siguiente: autor principal, año de publicación, país de origen, número de pacientes, OR e IC 95% (Tabla 1).

Control de calidad

Para evaluar la calidad metodológica de la investigación se utilizó el sistema de escala ordinal propuesto por Steels, et al.²⁴.

Método estadístico

Los resultados que se consideraron significativos tuvieron un valor de p que comparara la distribución

por grupos < 0.05 . Debido a que se trató de una revisión de la literatura, no se utilizaron pruebas paramétricas ni no paramétricas.

Resultados

Características de los artículos incluidos

El objetivo de este trabajo fue identificar la base científica para considerar el uso de biomarcadores en gliomas de alto grado. Se realizó un flujograma (Fig. 1) para identificar los trabajos elegibles de acuerdo a los criterios de inclusión utilizando términos MeSH. En PubMed se encontraron 42 artículos; en Embase, 30, y en Ovid, 96²⁵⁻³⁴. De los 168 artículos identificados sólo seis reunieron los criterios de búsqueda para la revisión (autor principal, año de publicación, país de origen, número de pacientes, OR e IC 95%).

En la primera fase se eliminaron 6 artículos por encontrarse repetidos, 5 carecían de resumen y 54 artículos no contenían la sección de resultados, por lo que finalmente se analizaron a profundidad sólo 6 artículos. No se identificó ningún artículo del continente americano. La publicación con la mayor población contó con 288 pacientes, todos correspondientes al grado histológico de glioblastoma.

Discusión

Los biomarcadores representan un reto para mejorar el desarrollo de métodos diagnósticos y de tratamiento de distintas enfermedades, con particular interés en los gliomas de alto grado. La comprensión de los procesos biológicos medibles y su significado clínico

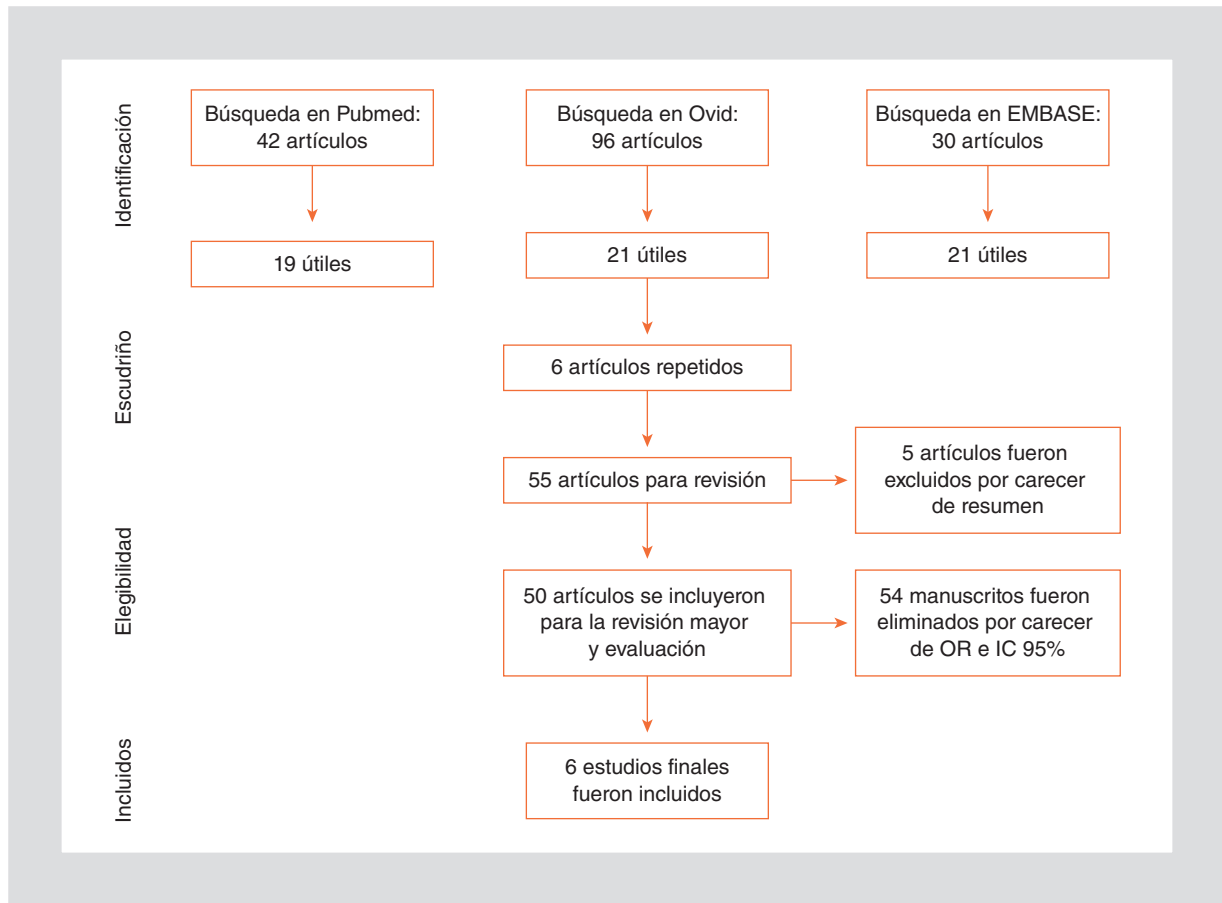


Figura 1. Flujo para la obtención de los artículos y su evaluación para el análisis.

es indispensable para ampliar la opción de tratamiento para las enfermedades. Durante los últimos 30 años se han realizado grandes ensayos clínicos para identificar biomarcadores en las principales enfermedades, como las cardiopatías y el cáncer. Se ha alentado la investigación en este ramo en la ciencia básica y clínica.

En los gliomas de alto grado se ha investigado como marcador de diagnóstico y pronóstico la delección 1p/19q a través de técnicas de hibridación *in situ*. Hay grupos que utilizan otros métodos para detectar la delección, como la PCR con microsatélites, que muestra porciones más grandes de delecciones 1p. Sin embargo, el impacto de la pérdida de 1p 19q no es consistente en la literatura, y el mejor método diagnóstico para esta prueba es la hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH) con OR 0.39 (0.25-0.60). La pérdida de 1p y 19q secundaria a la translocación centromérica inicialmente se asoció a la sensibilidad a la quimioterapia con agentes alquilantes y posteriormente como una respuesta a la radioterapia. La pérdida de 1p puede predecir la sobrevida en los gliomas de bajo grado.

Se ha observado que la metilación del sitio promotor de MGMT tiene capacidad predictiva en la respuesta al tratamiento y la sobrevida de los pacientes con gliomas de alto grado. La diferencia en la sobrevida entre los pacientes con alta expresión de MGMT y los de baja expresión es de 8 frente a 29 meses ($p = 0.0002$)³⁵. La mutación de IDH1 es un marcador confiable para discernir entre glioblastomas primarios, glioblastomas secundarios y gliomas anaplásicos.

La sobrevida ha sido favorable, de hasta 31 meses, para los pacientes con mutación de IDH con OR de 0.33 e IC 95% de 0.25-0.42. En un grupo de 301 pacientes los factores de mejor pronóstico fueron la mutación de IDH, la metilación del sitio promotor de MGMT y la edad³⁶. La mayoría de estudios de metilación de MGMT se han realizado con extracción a partir de bloques de parafina; sin embargo, se ha mostrado mayor confiabilidad en el resultado cuando la muestra es procesada en fresco^{36,37}. Los biomarcadores pueden ser obtenidos de forma ambulatoria a través de una muestra de sangre periférica o de LCR^{21,38,39}.

Conclusiones

Los biomarcadores son herramientas prometedoras para la detección temprana de enfermedades como el glioma de alto grado. Sin embargo, la falta de estandarización en los procesos metodológicos ha retrasado su avance y la replicación de los ensayos clínicos para obtener la validez clínica que permita establecer una predicción certera del desenlace de los pacientes con cáncer, particularmente, con gliomas de alto grado.

Bibliografía

1. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx*. 2004;1(2):182-8.
2. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463-6.
3. Naylor S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003;3(5):525-9.
4. Pepe MS, Thompson ML. Combining diagnostic test results to increase accuracy. *Biostatistics*. 2000;1(2):123-40.
5. Mikeska T, Craig JM. DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes*. 2014;5(3):821-64.
6. Floyd D, Purow B. Micro-masters of glioblastoma biology and therapy: increasingly recognized roles for microRNAs. *Neuro Oncol*. 2014;16(5):622-7.
7. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *Ann Intern Med*. 2009;151(4):W65-94.
8. Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2012;38(3):271-91.
9. Cohen AL, Colman H. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat Res*. 2015;163:15-30.
10. Zou P, Xu H, Chen P, et al. IDH1/IDH2 mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: a meta-analysis. *PLoS one*. 2013;8(7):e68782.
11. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-12.
12. Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;68(1):1-11.
13. Riemenschneider MJ, Hegi ME, Reifenberger G. MGMT promoter methylation in malignant gliomas. *Target Oncol*. 2010;5(3):161-5.
14. Zhang W, Zhang J, Hoadley K, et al. miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. *Neuro Oncol*. 2012;14(6):712-9.
15. Ang C, Guiot MC, Ramanakumar AV, Roberge D, Kavan P. Clinical significance of molecular biomarkers in glioblastoma. *Can J Neurol Sci*. 2010;37(5):625-30.
16. Castellanos-Rizaldos E, Milbury CA, Karatza E, Chen CC, Makrigiorgos GM, Merewood A. COLD-PCR amplification of bisulfite-converted DNA allows the enrichment and sequencing of rare un-methylated genomic regions. *PLoS one*. 2014;9(4):e94103.
17. Chen Y, Hu F, Zhou Y, Chen W, Shao H, Zhang Y. MGMT promoter methylation and glioblastoma prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Med Res*. 2013;44(4):281-90.
18. Mathupala SP, Mittal S, Guthikonda M, Sloan AE. MicroRNA and brain tumors: a cause and a cure? *DNA Cell Biol*. 2007;26(5):301-10.
19. Wang XF, Shi ZM, Wang XR, et al. MiR-181d acts as a tumor suppressor in glioma by targeting K-ras and Bcl-2. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(4):573-84.
20. Xue J, Niu J, Wu J, Wu ZH. MicroRNAs in cancer therapeutic response: Friend and foe. *World J Clin Oncol*. 2014;5(4):730-43.
21. Teplyuk NM, Mollenhauer B, Gabriely G, et al. MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. *Neuro Oncol*. 2012;14(6):689-700.
22. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *Ann Intern Med*. 2009;151(4):W65-94.
23. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. *Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group*. *JAMA*. 2000;283(15):2008-12.
24. Steels E, Paesmans M, Berghmans T, et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J*. 2001;18(4):705-19.
25. Mizoguchi M, Guan Y, Yoshimoto K, et al. Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma. *Front Oncol*. 2013;3:19.
26. Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro Oncol*. 2013;15(1):4-27.
27. Prickett TD, Samuels Y. Molecular pathways: dysregulated glutamatergic signaling pathways in cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(16):4240-6.
28. Weller M, Stupp R, Hegi M, Wick W. Individualized targeted therapy for glioblastoma: fact or fiction? *Cancer J*. 2012;18(1):40-4.
29. Laperriere N, Weller M, Stupp R, et al. Optimal management of elderly patients with glioblastoma. *Cancer Treat Rev*. 2013;39(4):350-7.
30. Parikh K, Peppelenbosch MP. Kinome profiling of clinical cancer specimens. *Cancer Res*. 2010;70(7):2575-8.
31. Pedeboscq S, L'Azou B, Passagne I, et al. Anticancer drugs exert differential apoptotic and cytotoxic effects on glioblastoma primary cultures with various EGFR and bcl-2 profiles. *J Exp Ther Oncol*. 2009;8(2):105-16.
32. Jain RK, Duda DG, Willett CG, et al. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(6):327-38.
33. Nano R, Capelli E, Facoetti A, Benericetti E. Immunobiological and experimental aspects of malignant astrocytoma. *Anticancer Res*. 2009;29(7):2461-5.
34. Chang SM, Lamborn KR, Kuhn JG, et al. Neurooncology clinical trial design for targeted therapies: lessons learned from the North American Brain Tumor Consortium. *Neuro Oncol*. 2008;10(4):631-42.
35. Jaeckle KA, Eyre HJ, Townsend JJ, et al. Correlation of tumor O6-methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1998;16(10):3310-5.
36. Mendez G, Ozpinar A, Raskin J, Gultekin SH, Ross DA. Case comparison and literature review of glioblastoma: A tale of two tumors. *Surg Neurol Int*. 2014;5:121.
37. Parkinson JF, Wheeler HR, Clarkson A, McKenzie CA, Biggs MT, Little NS, et al. Variation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *J Neuro Oncol*. 2008;87(1):71-8.
38. Akers JC, Ramakrishnan V, Kim R, et al. MiR-21 in the extracellular vesicles (EVs) of cerebrospinal fluid (CSF): a platform for glioblastoma biomarker development. *PLoS one*. 2013;8(10):e78115.
39. Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Ishigooka J, Kato T. Comprehensive DNA methylation analysis of human peripheral blood leukocytes and lymphoblastoid cell lines. *Epigenetics*. 2011;6(4):508-15.
40. Laxton RC, Popov S, Doey L, et al. Primary glioblastoma with oligodendroglial differentiation has better clinical outcome but no difference in common biological markers compared with other types of glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2013;15(12):1635-43.
41. Collet B, Guitton N, Saikali S, et al. Differential analysis of glioblastoma multiforme proteome by a 2D-DIGE approach. *Proteome Sci*. 2011;9(1):16.
42. Medina Villaamil V, Alvarez Garcia A, Aparicio Gallego G, et al. Tissue array analysis for the differentiation of gliosis from gliomas. *Mol Med Rep*. 2011;4(3):451-7.
43. Yakut T, Gutenberg A, Bekar A, et al. Correlation of chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization and expression of EGFR, PTEN, p53, and MIB-1 in diffuse gliomas. *Oncol Rep*. 2007;17(5):1037-43.
44. Demirci U, Yaman M, Buyukberber S, et al. Prognostic importance of markers for inflammation, angiogenesis and apoptosis in high grade glial tumors during temozolomide and radiotherapy. *Int Immunopharmacol*. 2012;14(4):546-9.
45. Jha P, Suri V, Jain A, et al. O6-methylguanine DNA methyltransferase gene promoter methylation status in gliomas and its correlation with other molecular alterations: first Indian report with review of challenges for use in customized treatment. *Neurosurg*. 2010;67(6):1681-91.
46. Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol*. 2008;86(1):31-45.