

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

“Metilación del Promotor de la Enzima MGMT (O6–metilguanina-DNA metiltransferasa) y Expresión de MGMT y CD133 como Marcadores Pronósticos en Pacientes con Glioblastoma Multiforme Tratados con Temozolamida y Radioterapia”.

Memoria presentada por Dña. Beatriz González Astorga para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Granada, 12 de Enero de 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Beatriz González Astorga
D.L.: GR 1889-2012
ISBN: 978-84-9028-075-1

Dra. CONSOLACIÓN MELGUIZO ALONSO,
CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO ANATOMÍA Y EMBRIOLGÍA
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D^a **BEATRIZ GONZÁLEZ ASTORGA** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Metilación del Promotor de la Enzima MGMT (O⁶-metilguanina-DNA metiltransferasa) y Expresión de MGMT y CD133 como Marcadores Pronósticos en Pacientes con Glioblastoma Multiforme Tratados con Temozolamida y Radioterapia”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 12 de Enero de 2012.

Fdo: Dra. Dña. Consolación Melguizo Alonso
Catedrática de Universidad

Dr. JOSE CARLOS PRADOS SALAZAR,
CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO ANATOMÍA Y EMBRIOLGÍA
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D^a **BEATRIZ GONZÁLEZ ASTORGA** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Metilación del Promotor de la Enzima MGMT (O⁶-metilguanina-DNA metiltransferasa) y Expresión de MGMT y CD133 como Marcadores Pronósticos en Pacientes con Glioblastoma Multiforme Tratados con Temozolamida y Radioterapia”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 12 de Enero de 2012.

Fdo: Dr. D. Jose Carlos Prados Salazar
Catedrático de Universidad

Dra. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ,
CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO ANATOMÍA Y EMBRIOLGÍA
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D^a **BEATRIZ GONZÁLEZ ASTORGA** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Metilación del Promotor de la Enzima MGMT (O⁶-metilguanina-DNA metiltransferasa) y Expresión de MGMT y CD133 como Marcadores Pronósticos en Pacientes con Glioblastoma Multiforme Tratados con Temozolamida y Radioterapia”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 12 de Enero de 2012.

A mis dos amores, mi marido y mi hijo Luis.
A mi madre M^a Concepción, y a mi padre Antonio.
Por ellos y para ellos.

Agradecimientos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

A la Dra. Antonia Aránega, que me brindó la oportunidad y puso a mi disposición todo el soporte del Departamento de Anatomía y Embriología Humana, haciendo posible con su dirección y ayuda la realización de este trabajo.

A mis co-directores, Consolación Melguizo y Jose Carlos Prados, por la paciencia que han tenido conmigo, por su apoyo y confianza en que algún día lo lograríamos. Gracias por vuestras enseñanzas en mi formación como investigadora y que éste sea el comienzo de nuevos proyectos juntos.

Como no a Raquel, que me contagió su ilusión por la investigación y que me dio el empujón que necesitaba para embarcarme en este proyecto.

A Raúl Ortiz, Jaime, Gloria, que han contribuido con su esfuerzo y trabajo a la realización de este trabajo, y que tan bien se han portado conmigo.

Al resto de los miembros del Departamento de Anatomía y Embriología Humana.

Al Servicio de Anatomía Patológica del H.U. Virgen de las Nieves, en especial al Dr. Ángel Concha y Rodrigo, por poner a mi disposición el material, soporte y trabajo necesario.

A Manuela Expósito por su inmejorable asesoramiento estadístico.

A mi marido Luis, mi gran apoyo en los buenos y los malos momentos. Gracias por saber comprenderme, apoyarme y animarme a conseguir mis metas. Sin ti esto no habría sido posible, porque parte del tiempo invertido era también el tuyo. Y gracias por darme lo mejor de este mundo, nuestro hijo Luis (y el que viene en camino).

A mi familia, motor de mi vida y ejemplo de superación: mi madre, mi hermana y mi padre que, aunque ya no está con nosotros, siempre guía mi camino y es mi modelo a seguir. Y también a mi familia política que siempre que la he necesitado ha estado ahí.

Mi más sincero agradecimiento a mis compañeros; Juan Ramón, Encarna, Vicky, Pedro, los dos Javier, Vero, Carmen, Joaquina, Arancha, Jesús, Cynthia, Julia, Pilar, Rosa, Isabel, y al resto del Servicio de Oncología Médica del Hospital Virgen de las Nieves, donde me formé como Oncóloga y tengo la gran suerte de seguir trabajando. Gracias por enseñarme todo lo que sé, y por hacer que mi trabajo sea algo maravilloso.

A los pacientes, que en momentos difíciles, nos enseñan como vivir.

A todos ellos, muchas gracias.

*“Predecir es muy difícil, ...
... especialmente cuando se trata de predecir el futuro.”*

Niels Bohr

Premio Nobel Física, 1922.

Índice

SUMMARY	1
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	
1. Epidemiología	15
1.1 Incidencia y prevalencia	15
1.2 Factores de riesgo	18
2. Clasificación anatómo-patológica	19
3. Clínica	25
3.1 Síntomas de hipertensión intracraneal	25
3.2 Síndromes focales	27
4. Diagnóstico	28
4.1 Historia clínica y examen físico	28
4.2 Tomografía computerizada	29
4.3 Resonancia magnética	29
4.4 Resonancia con espectroscopia	33
4.5 RM de perfusión	35
4.6 RM de difusión	35
4.7 SPECT cerebral	35
4.8 Tomografía por emisión de positrones (PET)	37
4.9 Filiación histológica	38
4.10 Diagnóstico de pseudoprogresión	38
5. Tratamiento	40
5.1 Tratamiento sintomático	40
5.2 Cirugía	40
5.3 Radioterapia	44
5.4 Quimioterapia local	51
5.5 Quimioterapia sistémica	53
5.5.1 Razones para su uso	53
5.5.2 Temozolamida	53
5.5.3 Estudios de adyuvancia	55
5.5.4 Estudios en recaída	59
5.6 Conclusiones generales del tratamiento	65

6. Factores pronósticos	66
6.1 Relacionados con el tumor	66
6.2 Relacionados con el paciente	67
6.3 Relacionados con el tratamiento	69
6.4 Clasificación pronostica	69
7. Alteraciones genéticas	71
7.1 Pérdida de heterocigosidad (LOH) del cromosoma 10	72
7.2 Alteraciones de la vía TP53/MDM2/p14 ^{ARF}	72
7.3 Alteraciones de la vía <i>p16ink4/RB1/CDK4</i>	73
7.4 Alteraciones de la vía EGFR/PTEN/Akt/Mtor	74
7.5 Factores de crecimiento y angiogénicos	75
7.6 Regulación epigenética	75
7.7 Alteraciones moleculares del oligodendroglioma	76
8. Alteraciones en las vías de reparación del ADN:	
Metil-guanina-O6-DNA metiltransferasa (MGMT)	76
8.1 Mecanismo de acción de MGMT	76
8.2 Silenciamiento epigenético: Metilación de MGMT	78
8.3 Estudios que relacionan la metilación MGMT y la respuesta a agentes alquilantes	85
8.3.1 Análisis del estudio EORTC/NCIC 26981/22981	85
8.3.2 Análisis del estudio RTOG 0525	87
8.3.3 Análisis del estudio EORTC 26951	88
8.3.4 Análisis del estudio NOA-04	88
8.4 Depleción de MGMT	88
8.5 Determinación analítica de MGMT	89
8.6 Implicaciones clínicas	89
9. Células madre de glioma	90
9.1 Identificación de las CSC	92
9.2 Efecto de la temozolamida sobre las CSC de gliomas	94
9.3 Efecto de la radioterapia sobre las CSC de gliomas	95
9.4 Fenómenos de resistencia en CSC	96
9.5 Papel pronóstico	100
9.6 Implicaciones clínicas	100

OBJETIVES	101
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Materiales	107
1.1 Población de estudio	107
1.2 Muestras de tejido cerebral tumoral	107
2. Métodos	108
2.1 Determinación de la metilación de MGMT	108
2.1.1 Desparafinación de las muestras	108
2.1.2 Digestión del tejido desparafinado	109
2.1.3 Eliminación de interacciones ADN-parafolmadehído	109
2.1.4 Extracción de ADN del tejido desparafinado	110
2.1.5 Pretratamiento del DNA extraído de las muestras incluidas en parafina con bisulfito sódico.	111
2.1.6 PCR específica de metilación (MSP)	116
2.1.7 Electroforesis de Gel de Agarosa de PCR obtenidas	117
2.2 Estudio inmuno histoquímico	118
2.2.1 Procedimiento y anticuerpos	118
2.2.2 Lectura de la expresión	120
2.3 Pacientes: Registro de datos	121
2.4 Estudio estadístico	123
RESULTADOS	
1. Determinación de la metilación del promotor de MGMT	127
1.1 Optimización de la técnica de extracción de ADN de muestras tumorales incluidas en parafina	127
1.2 Análisis de metilación del promotor de MGMT	135
2. Estudio inmuno histoquímico	139
3. Análisis de supervivencia del global de los pacientes	146
4. Análisis supervivencia grupo de pacientes Italia	151
5. Análisis supervivencia grupo pacientes HUVN	155
5.1 Características clínicas y anatomopatológicas	155
5.2 Características del tratamiento	156
5.3 Respuesta al tratamiento	157

5.4 Supervivencia global	158
5.5 Supervivencia libre de progresión	167
5.6 Análisis univariable y multivariable de supervivencia	174
6. Subgrupos pronósticos	177
7. Análisis bivariable de respuesta	182
7.1 Variables relacionadas con la respuesta radiológica en el global de los pacientes	182
7.2 Variables relacionadas con la respuesta clínica grupo HUVN	182
7.3 Variables relacionadas con la respuesta radiológica grupo HUVN	184
8. Pacientes reintervenidos	187
DISCUSIÓN	189
CONCLUSIONS	225
CONCLUSIONES	229
BIBLIOGRAFIA	233

Summary

The glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive glioma in the adult population and is a rapidly progressive disease with an average overall survival rate of less than one year. Surgery should be the initial treatment whenever possible since it will allow for a histological diagnosis, improve symptomatology, increase the effectiveness of later chemoradiotherapy and increase chances of survival. From the study of Stupp et al, published in 2005, radiotherapy with simultaneous temozolomide followed by adjuvant temozolomide has become the standard treatment for these patients.

However, despite results from the most recent studies, the prognosis for these tumors remains bleak. Today, we know that the methylation determination of the gene's promoter for the O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) enzyme has prognostic impacts. The drugs most commonly used in neuro-oncology (nitrosoureas, temozolomide, procarbazine) are effective because of the chloroethyl or methyl effects on the DNA. The O6-methylguanine-DNA methyltransferase enzyme repairs the DNA by directly eliminating an alkyl group from the O6 atom of the guanine found in the DNA of cells exposed to alkylating agents. One of the epigenetic mechanisms of genetic inactivation consists of the aberrant methylation of the cytosine of the CpG islands in the 5' regions corresponding to the genetic promoters. If the gene's promoter for the MGMT enzyme has experienced methylation, the gene is silenced and does not produce the repairing protein, meaning that the lesion produced by the chemotherapy on the tumoral cell becomes irreversible and the cell enters into apoptosis. The treatment is more effective if there is no protein, and therefore, if the MGMT gene presents methylation of the promoter. Several studies have analyzed the impact of the methylation status on the MGMT gene's promoter. They analyzed patients with GBM from the EORTC/NCIC study done by Stupp, et al, who had first been treated with radiotherapy +/- temozolomide. They found a methylation of the gene in 45% of patients, by methylation-specific PCR (MSP). The average survival rate increased in patients with gene methylation when compared to those who did not show it (18.2 m and 12.2 m, respectively, $p < 0.001$). Based on the technical difficulty implementing MSP technology in hospitals, scientists have tried to determine the proteic expression of MGMT using immunohistochemistry and

establish the different prognostic correlations. Results have been quite controversial.

The latest research shows that the tumors derive from a pluripotent stem cell with phenotypic and genotypic stem cell characteristics (*Cancer Stem Cell, CSC*), which makes the tumor more resistance to treatment. The glioma stem cells (*Glioma Stem Cell, GCS*) make up a small fraction of the total cells in the tumor and are characterized by having a surface protein called CD133. The CD133 may be a molecular marker that helps to understand the patients' prognosis and select an optimal treatment.

In this study we applied molecular biology and immunohistochemical techniques to clinical samples of patients with glioblastoma multiforme in order to confirm the value of established prognostic markers in our own group of patients and make progress on determining new prognostic or predictive markers of response to treatment of glioblastoma multiforme. One of the main objectives of our study was to standardize the methylation determination technique through MSP, by taking multiple extractions of DNA in paraffin samples, we have been able to identify the process that had the best results in terms of ratio and concentration. We applied that process to the GBM samples and confirmed that MGMT methylation is a prognostic factor for survival and predictive of response to treatment with radiotherapy and temozolomide. Later, we proceeded to analyze the MGMT expression through immunohistochemistry in our samples, applying the Bond™ Polymer Refine Detection (DS98009) system. The purpose of using the automatic Bond™ system was to obtain reliable results without interobserver variability. We did not find a prognostic impact on MGMT expression in the GBM, nor a significant correlation between methylation and the MGMT level, which supported the hypothesis that regulation of the presence of this enzyme is extremely complex and must be explained further. We also analyzed the CD133 presence through immunohistochemistry, as a marker of GCS and its prognostic impact. We used the Bond™ Polymer Refine Detection (DS98009) system and the polyclonal antibody 19898 (Abcam). In the study of patients with GBM, the presence of CD133 was not a factor for survival prognosis, nor a factor that predicted the response to treatment. However, when we analyzed the sub-group of patients from the Virgen de las Nieves Hospital in Granada independently, the presence

of CD133 did have statistical significance in terms of overall survival. Survival was 13 months for those patients with a low presence (+) compared to 20 months for those with a high presence (++) (p=0.05). This data contradicts what had been observed in the other studies, in which a high expression is an adverse factor or has no effect on survival and adds to the hypothesis that the role of CD133 as a prognostic factor is discordant. In addition, the determination of other molecular markers, such as Ki-67 and p53, did not show significant prognosis in our group of patients. Finally, the study with a group of patients who were treated again due to progression of the disease after initial treatment with radiotherapy and temozolomide showed results that, though limited due to the number of patients analyzed, indicated a possible incidence of the treatment on the methylation of the MGMT promoter and CD133. It will be necessary to carry out further research to confirm this hypothesis. Therefore, our study confirms the prognostic value and prediction to the treatment response in the methylation determination of MGMT through MSP, while the role of other possible prognostic markers determined by immunohistochemical techniques remains unclear.

Resumen

El glioblastoma multiforme (GBM) representa el glioma más agresivo en la población adulta y es una enfermedad rápidamente progresiva con una mediana de supervivencia global inferior a un año. La cirugía debe ser el tratamiento inicial siempre que sea posible; ya que permite obtener un diagnóstico histológico, mejorar la sintomatología, aumentar la eficacia de la quimiorradioterapia posterior y aumentar la supervivencia. Desde el estudio de Stupp y cols, publicado en el año 2005, la radioterapia con temozolamida concurrente seguida de temozolamida adyuvante se ha convertido en el estándar de tratamiento de estos pacientes.

Sin embargo, a pesar de los resultados de las investigaciones más recientes, el pronóstico de estos tumores permanece sombrío. Hoy conocemos que la determinación de la metilación del promotor del gen de la enzima metilguanina-O6-DNA metiltransferasa (MGMT) tiene impacto pronóstico. Los fármacos más utilizados en neuro-oncología (nitrosureas, temozolamida, procarbazona) deben su efectividad a la lesión cloro-etiladora o metiladora que producen sobre el ADN. La enzima de reparación metilguanina-O6-metiltransferasa (MGMT) repara el ADN a través de la eliminación directa de un grupo alquilo del átomo O⁶ de la guanina en el ADN de las células expuestas a agentes alquilantes. Uno de los mecanismos epigenéticos de inactivación génica consiste en la metilación aberrante de la citosina presente en las islas CpG de las regiones 5' correspondientes a los promotores génicos. Si el promotor del gen de la enzima MGMT se encuentra metilado, el gen es silenciado y no se produce proteína reparadora; con lo que la lesión producida por la quimioterapia en la célula tumoral se convierte en irreversible y la célula entra en apoptosis. La efectividad del tratamiento es pues mejor si no hay proteína y por lo tanto si el gen *MGMT* presenta metilación del promotor. Diversos estudios han analizado el impacto del estatus de metilación del promotor del gen de MGMT. Se analizaron los pacientes con GBM pertenecientes al estudio de la EORTC/NCIC de Stupp y cols., tratados con radioterapia +/- temozolamida en primera línea. Se encontró la metilación del gen en el 45% de los pacientes, mediante PCR específica de metilación (MSP). La mediana de supervivencia global, independientemente del brazo de tratamiento asignado, estaba incrementada en los pacientes con metilación del gen comparados con los que no la tenían (18.2 m y 12.2 m respectivamente,

$p < 0.001$). En base a la dificultad técnica que supone la implantación en los Centros de la tecnología de MSP, se ha intentado determinar la expresión proteica de MGMT por inmunohistoquímica y establecer las diferentes correlaciones pronósticas, siendo los resultados muy controvertidos.

Las últimas investigaciones muestran que son tumores que derivan de una célula madre troncal pluripotencial con características fenotípicas y genotípicas de célula madre (*Cancer Stem Cell, CSC*), lo que le confiere una elevada resistencia a los tratamientos. Las células madre formadoras de gliomas (*Glioma Stem Cell, GCS*) suponen una pequeña fracción del total de las células que componen el tumor y se caracterizan por poseer una proteína de superficie denominada CD133, especulándose sobre la posibilidad de que CD133 pueda ser un marcador molecular que nos ayude a saber con más exactitud el pronóstico de estos pacientes y seleccionar su tratamiento óptimo.

En este trabajo se aplican en muestras clínicas de pacientes con glioblastoma multiforme, técnicas de biología molecular y de inmunohistoquímica, con el objeto de confirmar el valor de marcadores pronósticos establecidos en nuestro propio grupo de pacientes y avanzar en la determinación de nuevos marcadores pronósticos o predictivos de respuesta al tratamiento de los glioblastomas multiformes. Uno de los objetivos principales de nuestro estudio fue estandarizar la técnica de determinación de metilación mediante PCR específica de metilación (MSP), tras la realización de múltiples protocolos de extracción de ADN en muestras incluidas en parafina se encontró el protocolo que permitió obtener los mejores resultados en cuanto a ratio y concentración. Aplicamos dicho protocolo a las muestras de GBM y confirmamos que la metilación de MGMT es factor pronóstico de supervivencia y factor predictivo de respuesta al tratamiento con radioterapia y temozolamida. Posteriormente procedimos a analizar la expresión de MGMT mediante inmunohistoquímica en nuestras muestras aplicando el sistema Bond™ Polymer Refine Detection (DS98009). El objetivo de usar el sistema automático Bond™ era obtener unos resultados fiables, al no tener la variabilidad ínter observador. No encontramos impacto pronóstico en la expresión de MGMT en GBM y tampoco hubo una correlación significativa entre metilación y nivel de expresión de MGMT, lo que apoya la hipótesis de que la regulación de la expresión de esta enzima es un sistema extremadamente complejo que queda

por dilucidar. También analizamos la expresión de CD133 por inmunohistoquímica como marcador de las GCS y su impacto pronóstico. Se ha utilizado el sistema Bond™ Polymer Refine Detection (DS98009) y como anticuerpo, el policlonal 19898 (Abcam). En el estudio global de los pacientes con GBM, la expresión de CD133 no fue factor pronóstico de supervivencia ni factor predictivo de respuesta al tratamiento. No obstante, cuando se analizó de forma independiente el subgrupo de pacientes pertenecientes al Hospital Virgen de las Nieves de Granada, la expresión de CD133 sí alcanzó la significación estadística en supervivencia global, que fue de 13 meses en los pacientes con baja expresión (+) frente a 20 meses en los pacientes con alta expresión (++/+++) ($p=0.05$). Este dato viene a contradecir lo observado en otros estudios en los que la alta expresión es un factor adverso o bien no tiene efecto sobre la supervivencia y viene a sumarse a la hipótesis de que el papel de CD133 como marcador pronóstico es discordante. Por otra parte, la determinación de otros marcadores moleculares como Ki-67 y p53, no mostraron significación pronóstica en nuestro grupo de pacientes. Finalmente el estudio con un grupo de pacientes reintervenidos por progresión de la enfermedad tras el tratamiento con radioterapia y temozolamida, mostró resultados que, aunque limitados por el número de pacientes analizados, apuntan hacia una posible incidencia del propio tratamiento sobre la metilación del promotor de MGMT y CD133. Serán necesarios más amplios estudios para confirmar esta hipótesis. Por tanto, en nuestro estudio se confirma el valor pronóstico y predictivo de respuesta de la determinación de la metilación de MGMT mediante MSP, mientras que el papel de otros posibles marcadores pronósticos determinados por técnicas de inmunohistoquímica permanece sin aclarar.

Introducción

1. EPIDEMIOLOGIA

1.1 Incidencia y prevalencia.

Los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) constituyen alrededor del 2% del total de las neoplasias del adulto y de ellos, más del 60% son gliomas. Dentro de los gliomas de alto grado se incluyen una serie de tumores; glioblastoma multiforme (GBM), astrocitoma anaplásico (AA) y oligodendroglioma anaplásico (OA), que tienen en común que se originan en las células gliales y su alta capacidad de infiltrar el tejido cerebral adyacente. El astrocitoma anaplásico y el glioblastoma representan el 38% aproximadamente de los tumores cerebrales primarios (Levin y cols., 2001); siendo estos, junto con el oligodendroglioma anaplásico, el objeto de nuestro estudio.

La información del registro obtenida de la base de datos de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER) para 1996 a 2000 indica que la incidencia combinada de tumores invasores primarios del SNC en los Estados Unidos es de 6,6 por 100.000 personas anualmente, con una mortalidad estimada del orden de 4,7 por 100.000 personas anualmente (Ries y cols., 2003). En los Estados Unidos, en el año 2009, se diagnosticaron 22.070 nuevos casos de tumores cerebrales y de otros tumores del SNC, y 12.920 defunciones (ACS, 2009). Las tasas de incidencia son superiores en los varones, caucasianos y países desarrollados.

Las tasas de supervivencia a los 5 y los 10 años en Estados Unidos son del 29,1% y del 25,3%, de acuerdo con los datos de la American Cancer Society (ACS) en 2008, aunque estas tasas difieren según la histología y la edad. Por ejemplo el glioblastoma multiforme tiene una tasa de supervivencia a los 5 años del 3,3% mientras que en los gliomas de bajo grado las tasas de supervivencia a los 5 años son superiores al 70%.

La mediana de edad al diagnóstico es de 55 años, observándose una distribución bimodal edad dependiente, con una incidencia estimada de

3.1/100,000 por encima de los 4 años, de 1.8/100,000 entre los 15 y los 24 años y de 18/100,000 alrededor de los 65 años.

En España, tomando como referencia los datos del conjunto de registros de cáncer que abarcan aproximadamente a un 25% de la población española, los tumores primarios del SNC representan un 2% del total del cáncer en el adulto, y en los niños menores de 15 años un 19% lo que nos indica que se trata, al menos en los adultos, de un tumor poco frecuente. La incidencia anual de tumores cerebrales en España es de 2.000 casos, de los que un 60% son gliomas malignos. La incidencia anual de glioma de alto grado es aproximadamente de 2,4 por 100.000 adultos. Según los datos del área de epidemiología ambiental y cáncer del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto Carlos III en el año 2006 se produjeron 1387 defunciones, con una edad promedio a la defunción de 61.58 años y una tasa por 100,000 habitantes de 5.70 casos en hombres y 3.72 casos en mujeres (Figuras 1 y 2).

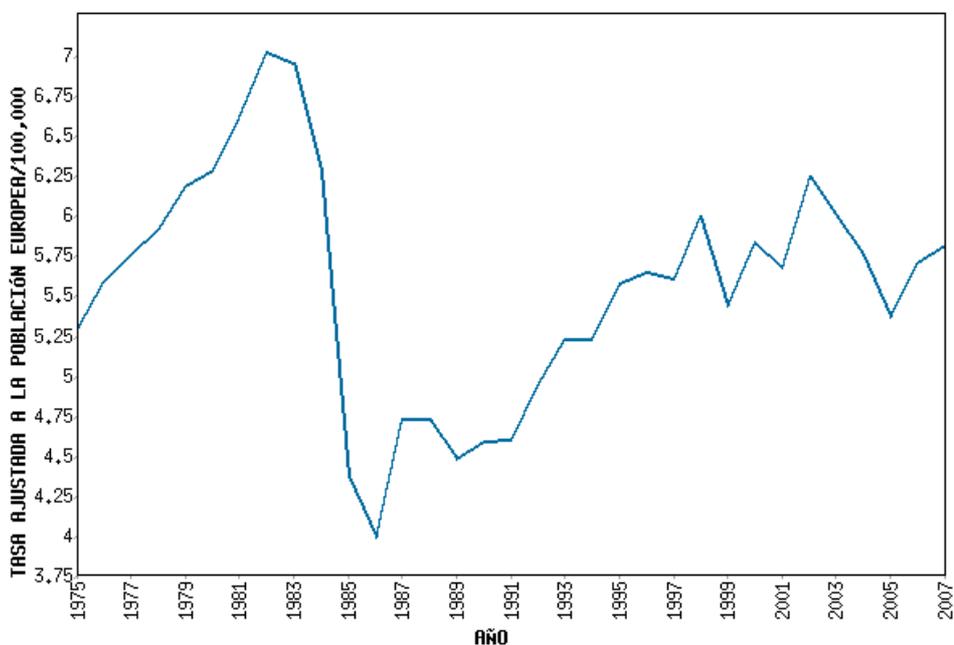


Figura 1: Tendencia temporal de la mortalidad por tumores cerebrales en España entre los años 1975 y 2007 en varones, Centro Nacional de Epidemiología ISCIII (<http://193.146.50.130/morta/consulta.php>).



Figura 2: Tendencia temporal de la mortalidad por tumores cerebrales en España en mujeres entre los años 1975 y 2007, Centro Nacional de Epidemiología ISCIII (<http://193.146.50.130/morta/consulta.php>).

En el SNC se localizan una gran variedad de tumores, debido a la gran diversidad de tipos celulares existentes en él, lo que ha dado lugar a múltiples cambios en su clasificación. Debido a esto y también a que los tumores de bajo grado muchas veces son asintomáticos y no se diagnostican y a que muchos tumores son diagnosticados radiológicamente pero no confirmados histológicamente, es difícil establecer con exactitud su incidencia y prevalencia (Figura 3).

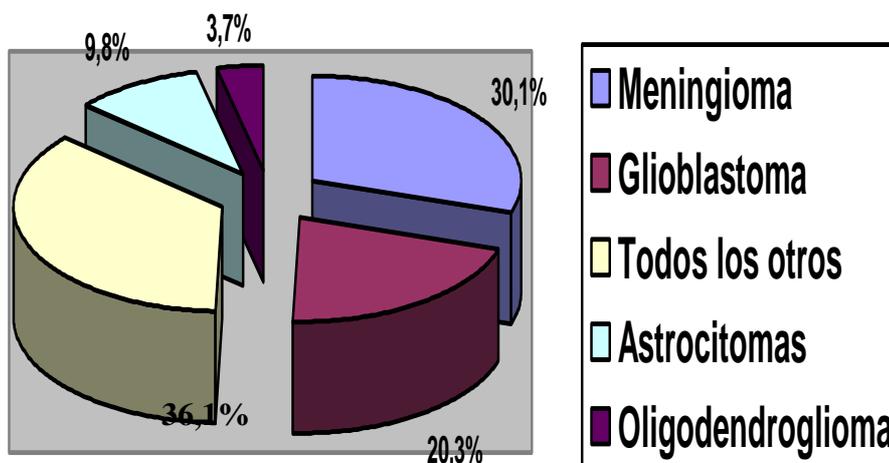


Figura 3: Distribución de la incidencia de tumores del SNC según subtipos histológicos, basándose en el Central Brain Tumor Registry of the Unit State database (CBTRUS, 2005).

1.2 Factores de riesgo.

- **Factores medio ambientales:**

Diversas sustancias químicas se han relacionado con estos tumores, debido a que los trabajadores de cierto tipo de industrias muestran una mayor incidencia de tumores cerebrales.

La exposición a radiaciones ionizantes es una causa aceptada de tumores cerebrales. La primera evidencia se tiene del seguimiento de niños israelíes que recibieron radioterapia para el tratamiento de la tiña capitis (Ron y cols., 1988). También se ha observado una alta tasa de meningiomas entre los supervivientes de la bomba atómica de Nagasaki e Hiroshima (Shibata y cols., 1994), (Shintani y cols., 1997) y en los niños supervivientes de tumores que fueron tratados con radioterapia (Neglia y cols., 2006).

La exposición a radiación no ionizante no está demostrada, aunque un estudio reciente relaciona el tiempo de uso del teléfono móvil con el riesgo de padecer un tumor cerebral (Hardell y cols., 2006).

- **Virus:**

El virus de la polio ha sido identificado en tejidos de tumores cerebrales humanos y puede inducirlos en animales (Rollison y cols., 2003), sin embargo no se demostró que incrementa el riesgo de padecer tumores cerebrales en personas (Engels y cols., 2003).

- **Síndromes hereditarios:**

Diversos síndromes hereditarios se relacionan con una mayor incidencia de gliomas como la neurofibromatosis tipo 1 y tipo 2, el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de von Hippel-Lindau y el síndrome de Turcot.

2. CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA.

La clasificación de los tumores cerebrales es compleja debido a la cantidad de tipos celulares existentes y que cada uno de ellos puede ser origen de neoplasias. A pesar de los recientes avances en el conocimiento de la biología molecular de los tumores del SNC la clasificación actual sigue estando basada en criterios morfológicos de histopatología clásica y su diagnóstico depende del conocimiento de ciertos factores básicos de cada uno de ellos.

La actual clasificación de la OMS del año 2007 (Louis y cols., 2007) es la evolución de diferentes sistemas de clasificación que arrancan desde el primer cuarto del siglo XX. En 1952 un comité de expertos se plantea la necesidad de establecer el diagnóstico de las neoplasias del SNC de acuerdo a criterios de localización anatómica, tipo histológico y grado de malignidad. Los esfuerzos de este colectivo culminan en 1979 con la publicación de la primera clasificación de la OMS basada en estos criterios que, con sucesivas revisiones, se mantiene hasta la actualidad (tabla 1). La clasificación de la OMS divide los tumores del sistema nervioso central en siete grupos: tumores neuroepiteliales, tumores de los nervios periféricos, tumores de las meninges, linfomas y tumores hematopoyéticos del sistema nervioso central, tumores germinales, tumores de la región selar y tumores metastáticos. De estos grupos son los tumores neuroepiteliales los que se consideran generalmente tumores cerebrales primarios.

Tabla 1: Clasificación del 2007 de la OMS para los tumores del SNC.

I. Tumores neuroepiteliales.

A. Tumores gliales:

1. Tumores astrocíticos:

1.1. Astrocitoma pilocítico (grado I)

1.2. Astrocitoma difuso (grado II), que incluye variantes: protoplásmico, gemistocítico y fibrilar

1.3. Astrocitoma anaplásico (grado III)

1.4. Glioblastoma multiforme (grado IV), que incluye variantes: glioblastoma de

células gigantes y gliosarcoma

1.5. Astrocitoma subependimario de células gigantes (grado I de la OMS)

1.6. Xantastrocitoma pleomórfico (grado I)

2. Tumores oligodendrogliales:

2.1. Oligodendroglioma (grado II)

2.2. Oligodendroglioma anaplásico (grado III)

3. Gliomas mixtos u oligoastrocitomas:

3.1. Oligoastrocitoma mixto (grado II)

3.2. Oligoastrocitoma anaplásico (grado III)

4. Tumores ependimarios:

4.1. Ependimoma mixopapilar

4.2. Subependimoma

4.3. Ependimoma (grado II) variantes: celular, papilar, epitelial, células claras, mixto.

4.4. Ependimoma anaplásico (grado III)

5. Tumores neuroepiteliales de origen incierto:

5.1. Astroblastoma (grado IV)

5.2. Glioma coroide del tercer ventrículo

5.3. Glioma angiocéntrico.

B. Tumores neuronales y mixtos neurogliales:

1. Gangliocitoma

2. Ganglioglioma

3. Ganglioglioma anaplásico

4. Tumor neuroepitelial disembrionárico

5. Neurocitoma extraventricular

6. Astrocitoma desmoplásico infantil

7. Paraganglioma

8. Tumor glioneuronal formador de rosetas del 4.º ventrículo

9. Tumor glioneuronal papilar

10. Liponeurocitoma cerebelar

11. Neurocitoma central

12. Gangliocitoma displásico del cerebelo

C. Tumores no gliales:

1. Tumores embrionarios:

1.1. Meduloblastoma, que incluye variantes: desmoplásico, con nodularidad, anaplásico y de células grandes

1.2. Tumores neuroectodérmicos primitivos del SNC, que incluyen variantes: neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, meduloepitelioma y ependimoblastoma

1.3. Tumor rabdoide/teratoide atípico

2. Tumores de los plexos coroideos:

2.1. Papiloma de plexos coroideos

2.2. Papiloma atípico de plexo coroideo

2.3. Carcinoma de plexos coroideos

3. Tumores del parénquima pineal:

3.1. Pineocitoma

3.2. Tumor del parénquima de la pineal de diferenciación intermedia

3.3. Pineoblastoma

3.4. Tumor papilar de la región pineal

II. Tumores de las meninges.

A. *Tumores de células meningoteliales:*

1. Meningioma con variantes: meningotelial, fibroso, transicional, psamomatoso, angiomaso, microquístico, secretorio, rico en linfoplasmacitos, metaplásico, de células claras, coroide (grado I)

2. Meningioma atípico, rabdoide, papilar (grado II)

3. Meningioma anaplásico (grado III)

B. *Tumores mesenquimales:*

1. Tumores osteocartilaginosos benignos: condroma, osteoma, osteocondroma

2. Condrosarcoma

3. Osteosarcoma

4. Rabdomioma

5. Rabdomiosarcoma

6. Lipoma, angiolioma, hibemoma

7. Liposarcoma

8. Histiocitoma fibroso

9. Fibrosarcoma

10. Hemangioma, hemangioendotelioma epitelioides, hemangiopericitoma

11. Hemangiopericitoma anaplásico

12. Angiosarcoma

13. Sarcoma de Kaposi

14. Sarcoma de Ewing

C. *Lesiones melanocíticas primarias:*

1. Melanosis difusa

2. Melanocitoma

3. Melanoma maligno

4. Melanomatosis meníngea

III. Tumores de células germinales.

1. Germinoma

2. Carcinoma embrionario

3. Tumor del seno endodérmico

4. Coriocarcinoma

5. Teratoma

- 6. Tumores germinales mixtos**
- IV. Tumores de la región selar.**
 - 1. Pituicitoma**
 - 2. Oncocitoma fusocelular de adenohipófisis**
 - 3. Tumor de célula granular**
 - 4. Craneofaringioma**
- V. Linfomas y neoplasias hematopoyéticas.**
 - 1. Linfoma primario maligno**
 - 2. Plasmocitoma**
 - 3. Sarcoma granulocítico**
- VI. Tumores de los nervios craneales y espinales.**
 - 1. Schwanoma (neurinoma, neurilemoma), que incluye variantes: celular, plexiforme y melanótico**
 - 2. Neurofibroma solitario y neurofibroma plexiforme**
 - 3. Perineurinoma y su variante maligna**
 - 4. Tumor maligno de la vaina (schwanoma maligno)**
- VII. Tumores metastáticos**

Esta última versión de la clasificación de los tumores del SNC es el fruto de una reunión de consenso entre 25 patólogos y genetistas, celebrada en el Centro Alemán para la Investigación del Cáncer, en Heidelberg a finales del año 2006 y el resultado está contenido en un fascículo de la Organización Mundial de la Salud (Louis y cols., 2007). En esencia la clasificación es la misma de la edición anterior (2000) a la cual se añaden nuevas entidades y variedades descritas o redefinidas en estos últimos 7 años.

A pesar de sus innegables ventajas aun hay problemas diagnósticos y la heterogeneidad tumoral y la subjetividad diagnóstica permiten a veces el solapamiento de grados, por ello algunos autores han intentado establecer unos criterios clínicos o morfológicos estrictos dentro de sistemas de diagnóstico con valor pronóstico. De estos trabajos el de mayor aceptación fue la clasificación de Ste. Anne-Mayo en 1988 que utiliza la presencia de cuatro parámetros puntuables (atipia nuclear, mitosis, proliferación vascular y necrosis) para establecer cuatro grados tumorales en función de la puntuación obtenida. La clasificación por grados de la OMS para los tumores del SNC

también establece una escala para determinar la malignidad según las características histológicas del tumor, que es la siguiente:

- El grado I de la OMS incluye lesiones de bajo potencial proliferativo y posibilidad de curación al cabo de la resección quirúrgica sola.

- El grado II de la OMS incluye lesiones que por lo general son infiltrantes y de baja actividad mitótica pero que recurren. Algunos tipos de tumores tienden a avanzar a grados más altos de malignidad.

- El grado III de la OMS incluye lesiones de malignidad histológica probada en general en forma de actividad mitótica, capacidad de infiltración claramente expresada y anaplasia.

- El grado IV de la OMS incluye lesiones que presentan una alta actividad mitótica, tendencia a la necrosis y, en general, están asociadas con evolución prequirúrgica y posquirúrgica rápida de la enfermedad.

Nuestro estudio se centra en los tumores gliales de alto grado más frecuentes: astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme y oligodendroglioma anaplásico (Figura 4).

- **Astrocitoma anaplásico (AA):**

Se trata de un glioma astrocítico infiltrante, grado III de la OMS de comportamiento agresivo y crecimiento relativamente rápido. Histológicamente se caracteriza por presentar actividad mitótica, atipia celular y una elevada densidad celular; sin embargo no presenta la proliferación vascular ni la necrosis característica de los glioblastomas. La mutación de p53 está presente en el 90% de los casos.

- **Glioblastoma multiforme (GBM):**

Se trata de un glioma astrocítico grado IV de la OMS de comportamiento altamente agresivo. Puede originarse *de novo* o primarios (en pacientes de edad avanzada y su característica genética más importante es la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR) o secundarios como transformación de un astrocitoma difuso o anaplásico (en pacientes más jóvenes y como característica genética la mutación de p53). Macroscópicamente produce irregularidad, firmeza, anomalías de la vascularización, necrosis central y tejido friable circundante. Microscópicamente se caracteriza por una gran heterogeneidad celular con grados variables de anaplasia. Es característica la necrosis con pseudoempalizada (por colocarse las células tumorales en torno a ella). La actividad mitótica es alta y se produce una proliferación vascular con patrones angiodisplásicos y formaciones glomerulares.

- **Oligodendroglioma anaplásico (OA):**

Menos frecuente que los dos anteriores. Se clasifica como un grado III de malignidad de la OMS. Microscópicamente se caracterizan por halos perinucleares y capilares en red de alambres. Genéticamente en un 75% de los casos hay pérdidas alélicas de 1p o 19q, y la pérdida combinada se da en un 60%.

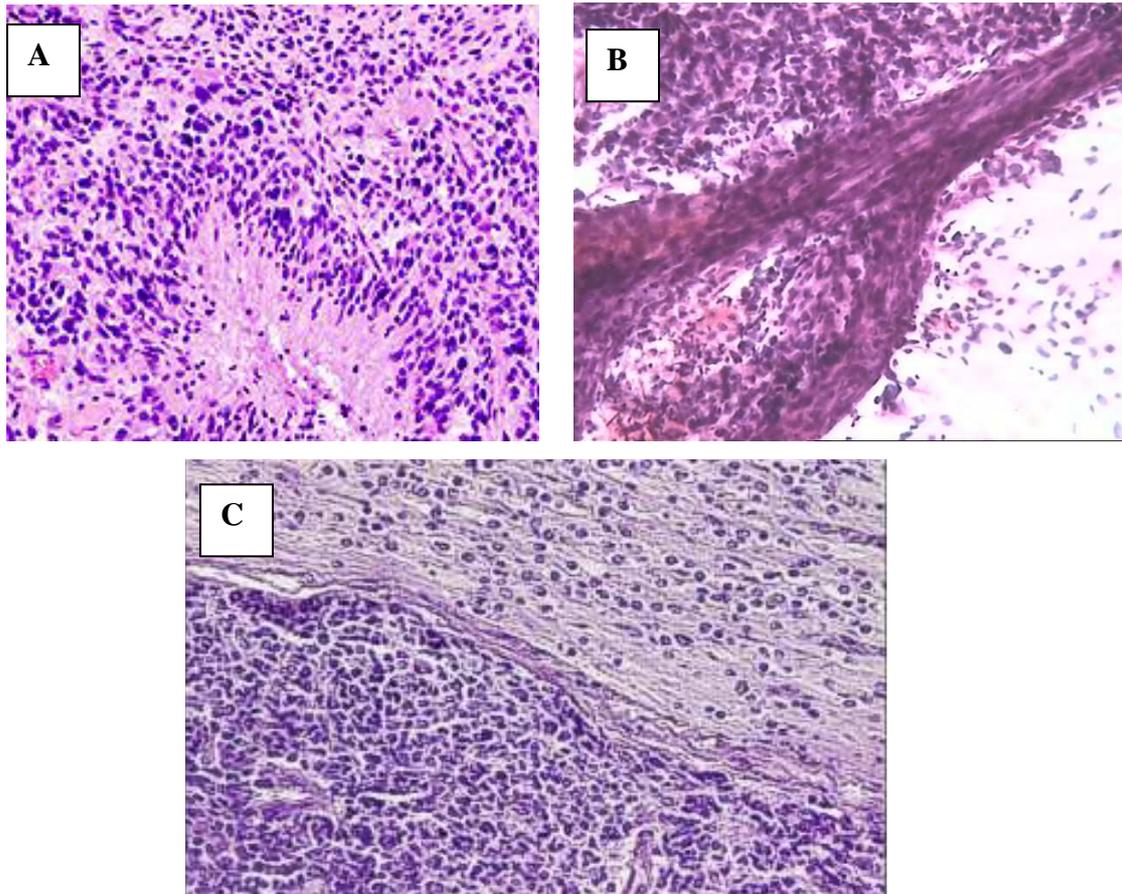


Figura 4: Histología de los principales gliomas de alto grado.

- A. Glioblastoma multiforme.
- B. Astrocitoma anaplásico.
- C. Oligodendroglioma anaplásico.

3. CLÍNICA

La presentación clínica de los tumores cerebrales depende de su localización anatómica. Los síntomas que producen se pueden dividir en dos tipos: los relacionados con el aumento de la presión intracraneal y los específicos de la localización (síndromes focales).

3.1 Síntomas de hipertensión intracraneal:

- Cefalea: es el síntoma más frecuente, está presente en el 90% de los pacientes. Se caracteriza por ser difusa, opresiva, aumentar con las

maniobras de valsalva y empeorar por la noche llegando a despertar al paciente.

- Náuseas y vómitos: de predominio matutino, en ayunas y bruscos.
- Edema de papila y alteraciones visuales.
- Trastornos del comportamiento.

El grado más grave de hipertensión intracraneal, son las hernias cerebrales, en las que el tejido cerebral se desplaza de su localización habitual e invade otros espacios comprimiendo sus estructuras (Figura 5). Las más frecuentes son la hernia central transtentorial de arriba a abajo (grandes tumores supratentoriales), la herniación uncal (tumores del lóbulo temporal), la herniación subfalciana (sobre todo tumores frontales), la transtentorial de abajo a arriba y la amigdalalar (tumores cerebelosos).

- (1) Hernia subfalciana.
- (2) Hernia central transtentorial.
- (3) Hernia uncal.
- (4) Hernia amigdalalar.

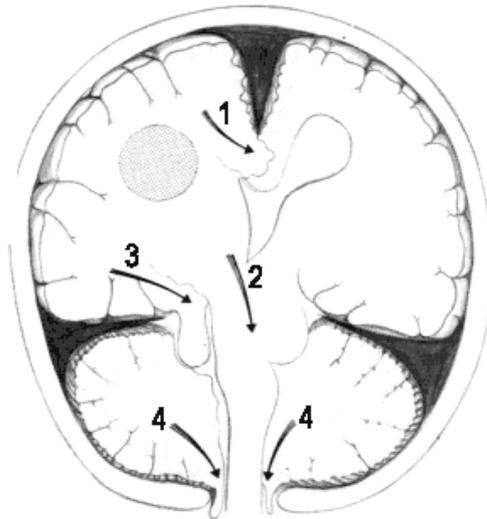


Figura 5: Hernias cerebrales.

3.2 Síndromes focales (Tabla 2):

Las lesiones ocupantes de espacio producen síntomas específicos según la localización sobre la que asienten. Éstos pueden ser positivos (crisis comiciales) o negativos (déficit neurológico como déficit motor en los tumores frontales, visuales en los tumores occipitales, afasia en los temporales,...)

Tabla 2: Síndromes focales.
I. Tumores del lóbulo frontal. <ul style="list-style-type: none">A. <i>Región prefrontal</i>: irritabilidad, depresión, incontinencia de esfínteres.B. <i>Región precentral</i>: crisis parciales motoras contralaterales, déficit motor progresivo.C. <i>Región frontobasal</i>: trastornos psíquicos, crisis parciales complejas con automatismos, afasia motora en el hemisferio dominante.
II. Tumores del lóbulo parietal. <ul style="list-style-type: none">A. <i>Región parietal posterior</i>: en el hemisferio dominante acalculia, agrafia, alexia y agnosia digital (síndrome de Gerstmann).B. <i>Región postrolándica</i>: crisis sensitivas y sensitivas motoras, estereoagnosia.
III. Tumores del lóbulo temporal. <ul style="list-style-type: none">A. <i>Región lateral</i>: Crisis parciales sensoriales con alucinaciones auditivas y vertiginosas, afasia de Wernicke en el hemisferio dominante.B. <i>Región medial</i>: crisis uncinadas, crisis parciales complejas con automatismos, cuadrantapnosia homónima superior.
IV. Tumores del lóbulo occipital. <p>Hemianopsia homónima, cuadrantapnosia homónima superior o inferior, agnosia visual, crisis visuales, micropsias, macropsias, metamorfosis, síndrome de Balint, síndrome de Anton-Babinski.</p>
V. Tumores de los ventrículos laterales. <p>Hipertensión intracraneal intermitente o crónica.</p>
VI. Tumores del área diencefálica. <ul style="list-style-type: none">A. <i>III ventrículo</i>: hipertensión intracraneal, síndromes neuroendocrinos hipotalámicos.B. <i>Hipotálamo</i>: síndromes neuroendocrinos.C. <i>Región pineal</i>: síndromes neuroendocrinos, hipertensión intracraneal.D. <i>Tálamo</i>: alteraciones de la sensibilidad profunda, mano talámica, déficit campimétricos.
VII. Tumores hemisféricos profundos. <p>Paresia espástica contralateral, hipertensión intracraneal.</p>

VIII. Tumores del cuerpo caloso.

Síndromes de desconexión derecha-izquierda, trastornos de la personalidad.

IX. Tumores del nervio óptico.

Exoftalmos unilateral no pulsátil, alteraciones del campo visual, amaurosis, signos de afectación hipotalámica, obstrucción del foramen de Monro, hipertensión intracraneal.

X. Tumores de la región selar y paraselar.

Hemianopsia homónima, síndromes neuroendocrinos, HTIC.

XI. Tumores del tronco del encéfalo.

Trastornos de la deglución, oculomotores, ataxia, pirimidismo y paresia bilaterales, hipertensión intracraneal.

XII. Tumores del cerebelo.

A. *Síndrome hemisférico*: ataxia apendicular (dismetría y disdiadococinesia), hipotonía, temblor cerebeloso, nistagmus.

B. *Síndrome vermiano*: ataxia axial, desequilibrio.

XIII. Tumores del IV ventrículo.

Síndrome de hipertensión intracraneal precoz.

4. DIAGNÓSTICO

Ante la sospecha clínica de un tumor cerebral las pruebas de imagen radiológicas (tomografía computerizada y resonancia magnética) juegan un papel fundamental en el diagnóstico. Su principal papel es determinar la localización, extensión de la lesión y su relación con las estructuras adyacentes. Ambas pruebas de imagen son complementarias. La resonancia magnética es la modalidad de elección complementándose con la tomografía computerizada en ocasiones.

4.1 Historia clínica y examen físico:

Una historia clínica detallada y un examen físico exhaustivo son fundamentales para sospechar un tumor cerebral, incluso la existencia de síndromes focales nos puede indicar la localización. La rapidez de instauración de la clínica nos puede indicar también el grado de agresividad del tumor.

4.2 Tomografía computerizada (TC):

Se trata de una prueba rápida y de fácil acceso. Es superior para la detección de calcificaciones, hemorragias agudas y cambios óseos relacionados con el tumor. También es la prueba de elección en pacientes inestables debido a su rapidez.

4.3 Resonancia magnética (RM):

Sus ventajas son no utilizar radiación ionizante, posibilidad de reconstrucción multiplanar, gran resolución de contraste, ausencia de artificios de estructuras óseas de la base de cráneo. Se considera actualmente la técnica de elección.

- **Protocolo radiológico:** (Hernán y cols., 2006)
 - Localización y extensión de la lesión: extra-axial vs. intra-axial (tabla 3), supratentorial vs. infratentorial, múltiple vs. única.
 - Caracterización y definición de los márgenes del tumor: La RM con contraste paramagnético (gadolinio) muestra captación del contorno externo de los tumores agresivos debido a la ruptura de la barrera hematoencefálica y a la vascularización propia del tumor.
 - Caracterización de la lesión: son isointensos-hipointensos en secuencias potenciadas en T1 e hiperintensos en T2, excepciones:
 - Alta intensidad de señal en T1: puede ser debida a la presencia de grasa, melanina, alta concentración de proteínas o hemorragia subaguda.
 - Baja intensidad de señal en secuencias T2 en lesiones no hemorrágicas: puede ser debida a su alta celularidad, mínimo fluido extracelular y tejido densamente fibroso.
 - Patrón de captación de contraste: en general las lesiones que no captan contraste suelen ser lesiones de bajo grado, mientras que las lesiones que captan contraste son de alto grado. El patrón de realce

puede ser intenso o débil, homogéneo o heterogéneo, sólido o en anillo (típico del GBM y de las lesiones metastásicas).

- Lesiones quístico-necróticas: las áreas de necrosis son cavidades hipocaptantes con paredes gruesas e irregulares y contenido de señal heterogéneo. Son un signo de malignidad.
- Lesiones hemorrágicas: las metástasis son las que producen sangrado con mayor frecuencia, también el GBM y el AA.
- Lesiones hipervascularizadas: las secuencias de RM de perfusión aportan información sobre el grado de vascularización del tumor.
- Efecto masa localizado o generalizado: se debe buscar la desviación de la línea media y el borrado de los surcos corticales.
- Presencia de edema.
- Herniación cerebral.

Tabla 3: Hallazgos en RM para distinguir masas intraaxiales de extraaxiales. (Cortés-Funes y cols., 2009)

Hallazgos	Intraaxiales	Extraaxiales
Localización	Central	Periférica
Cambios óseos	Infrecuentes	Frecuentes
Córtex	Expandido o edematoso	Respetado
Vasos	Desplazados periféricamente	Desplazados centralmente
Espacio subaracnoideo	Adelgazado	Aumentado
Invasión de la duramadre	Infrecuente	Frecuente
Desplazamiento de la duramadre	Periférico	Periférico en lesiones intradurales y central en extradurales
Realce de las meninges	Infrecuente	Frecuente

- **Astrocitoma anaplásico:**

Presenta márgenes mal definidos, un aspecto heterogéneo y casi siempre una intensa captación de contraste, un pronunciado edema vasogénico y efecto masa (Figura 6). La necrosis suele estar ausente.

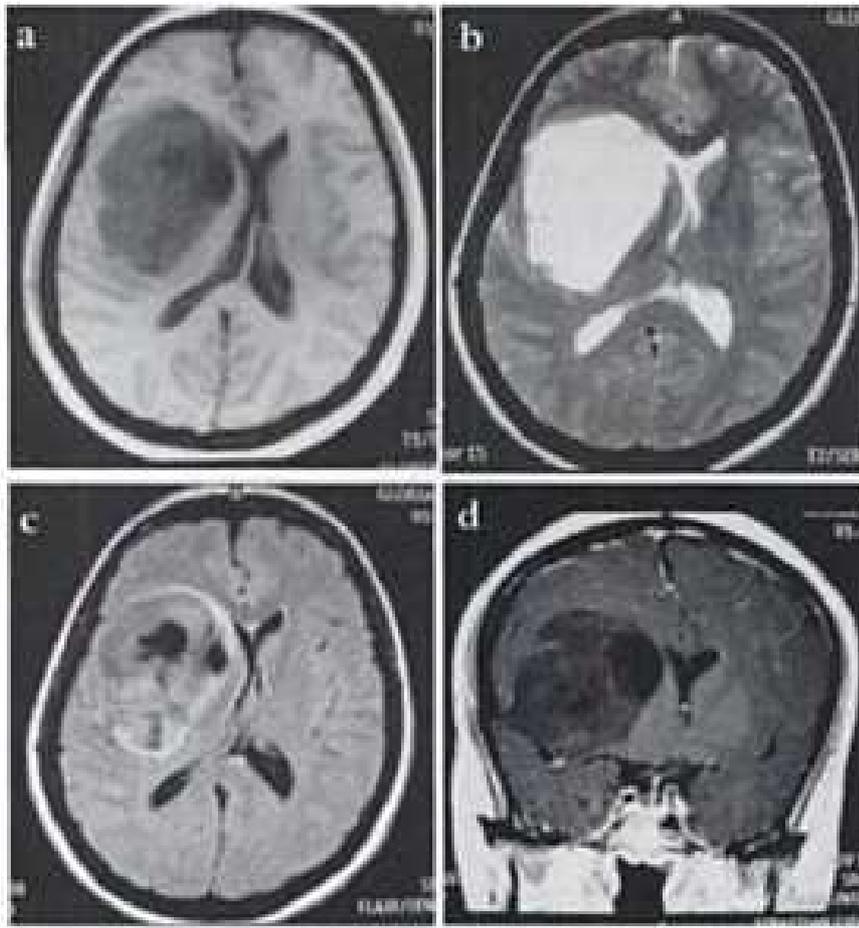


Figura 6: Astrocitoma anaplásico. RM simple y con contraste.

a) axial T1 simple **b)** axial T2 **c)** axial FLAIR **d)** coronal T1 con contraste.

Masa hipointensa en T1 e hiperintensa en T2 en lóbulo frontal e insular derecho.

- **Glioblastoma multiforme:**

Muestra una marcada heterogeneidad tumoral, con áreas de necrosis (característica) y hemorragias. Presenta una gran angiogénesis, edema perilesional y un efecto masa muy llamativo. El patrón de captación de contraste suele ser con realce en anillo (Figura 7).

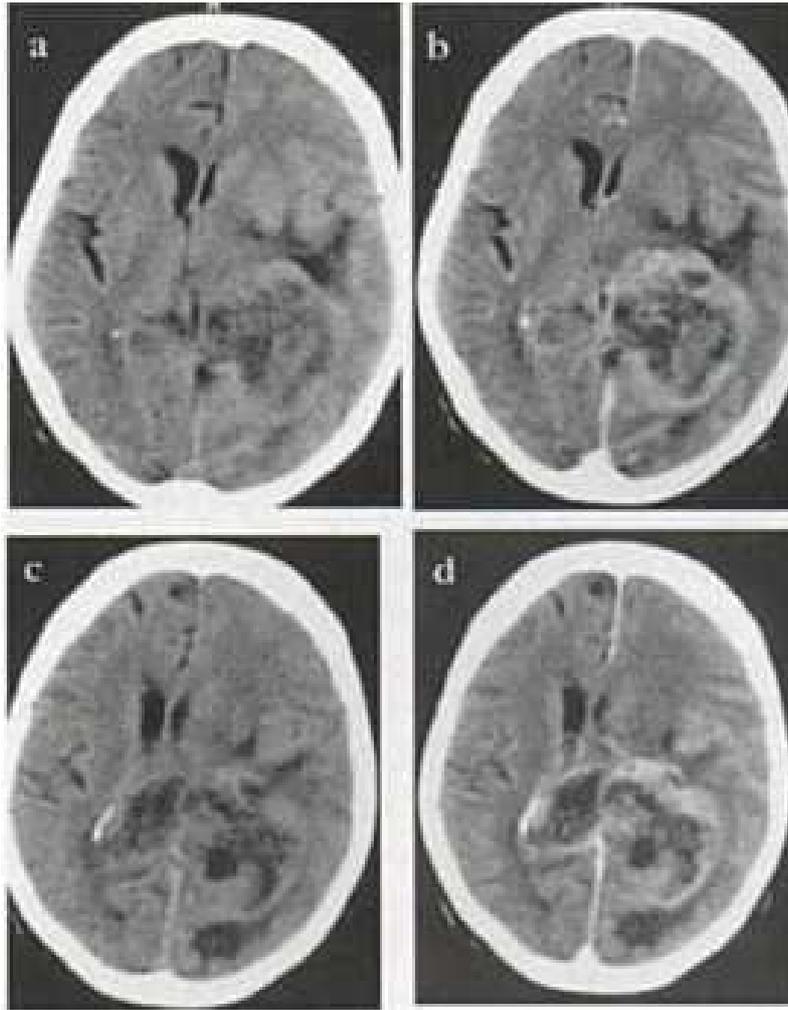


Figura 7: Glioblastoma multiforme. Imágenes axiales de TC. **a) y c)** sin contraste. **b) y d)** con contraste. Lesión parieto-occipital izquierda con edema vasogénico, necrosis, efecto masa y captación periférica de contraste.

- **Oligodendroglioma anaplásico:**

Se caracterizan por una localización superficial y presencia de calcificaciones (el 90% de los casos). Tienen una intensidad relativamente baja en secuencias potenciadas T2 y gran edema cerebral (Figura 8).

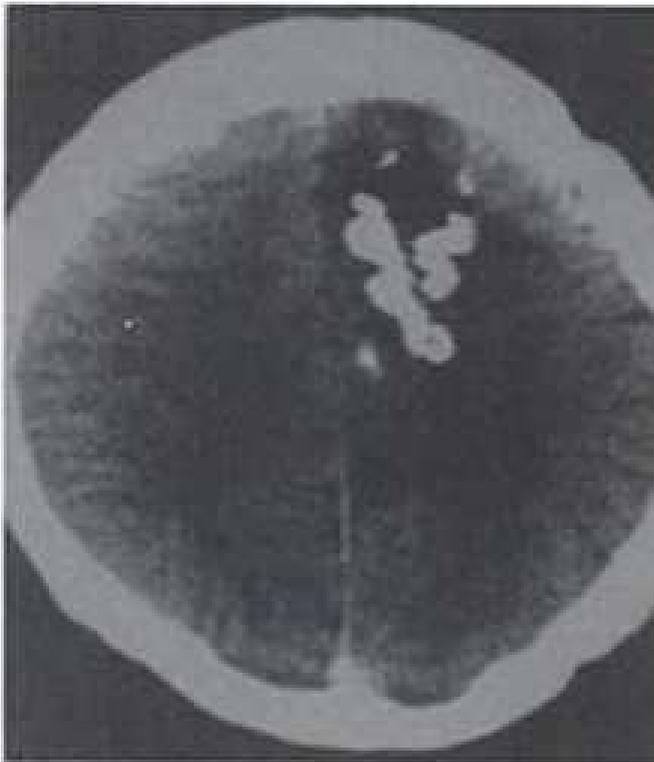


Figura 8: Oligodendroglioma. TC simple. Se observan las calcificaciones groseras típicas de este tumor.

4.4 Resonancia con espectroscopia:

La espectroscopia por resonancia magnética (ERM) permite el estudio del metabolismo cerebral in vivo, registrando las señales de los metabolitos presentes en el tejido cerebral. La ^1H -ERM (protón de hidrógeno) tiene muy buena sensibilidad para diferenciar el parénquima encefálico normal de las lesiones neoplásicas (Castillo y cols., 1996), sin embargo, su especificidad para distinguir el grado de malignidad histológica es menor.

En los gliomas de alto grado existe una elevación de la concentración de la colina (Cho), que es el hallazgo más importante y que se produce por la proliferación celular incrementada que produce un recambio acelerado de la membrana celular, donde la colina se encuentra en forma de fosfatidilcolina; una disminución moderada de la creatinina (Cr) y una disminución significativa del N-acetilaspártato (NAA), (Figura 9). Este patrón no es específico y ha sido reportado en lesiones no tumorales como en la adrenoleucodistrofia, en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y en la encefalomiелitis (Leclerc y cols., 2002). En los adultos la elevación del lactato (LA) se relaciona con un alto grado de malignidad y se demuestra con frecuencia en los glioblastomas multiformes.

La posibilidad de localizar las zonas con mayores alteraciones bioquímicas y de mayor densidad de células tumorales ha permitido definir con mayor exactitud los límites de la infiltración tumoral. La ^1H -ERM se ha empleado para monitorizar la respuesta a la quimioterapia y a la radioterapia.

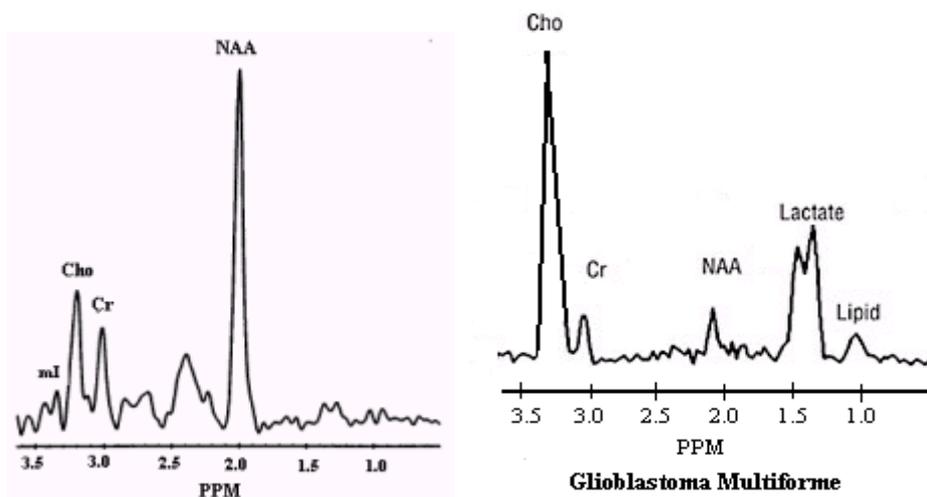


Figura 9: Espectroscopia cerebral normal y de un GBM.

4.5 RM perfusión:

La perfusión es la técnica funcional con un impacto más claro en el estudio de los gliomas. Permite obtener mapas de volumen sanguíneo regional (VSR) de todo el cerebro, con resolución espacial y temporal muy superior al SPECT y también a la PET. Un VSR similar al córtex normal (aproximadamente el doble de la sustancia blanca) correspondería a un glioma de alto grado y un VSR similar a la sustancia blanca normal correspondería a un glioma de bajo grado.

4.6 RM difusión:

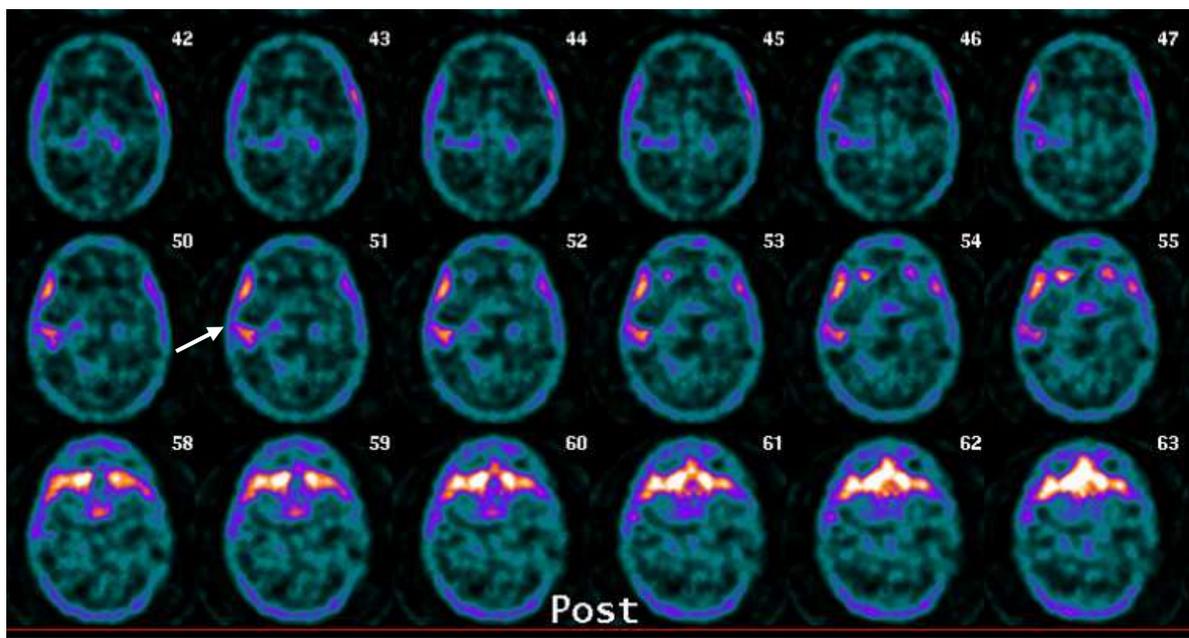
La difusión se basa en obtener contraste teniendo en cuenta la diferente movilidad de las moléculas. Con ésta técnica se obtiene un valor: el coeficiente de difusión aparente (ADC) que se modifica dependiendo del edema, la necrosis o diversas colecciones intra-lesionales (sangre, líquido o pus). En los gliomas es importante para diferenciar un tumor necrótico de un absceso. El ADC está relacionado con la celularidad, la reducción de ADC en los tumores indica agresividad.

4.7 SPECT cerebral:

La SPECT (Tomografía Computerizada por Emisión de Fotón Único) permite la obtención de imágenes funcionales cerebrales. La mayoría de los tumores se presentan como áreas hipoperfundidas respecto al cerebro normal, más intensas cuando existe necrosis intratumoral. Utilizando trazadores marcadores de viabilidad tumoral, se ha descrito la posibilidad de diferenciar el grado de malignidad de un tumor y diferenciar entre radionecrosis y recidiva tumoral, situaciones de importante implicación en el manejo clínico y/o terapéutico de estos pacientes en que la TAC y/o RM no son definitivas. En estos casos se realiza la SPECT cerebral con trazadores oncotropos, (Cloruro de Talio-201, el 99mTc-MIBI, 99mTc-Tetrofosmina) que no atraviesan la barrera hematoencefálica y por tanto no se fijan en el tejido cerebral normal. En el caso de los gliomas se ha demostrado una correlación entre el grado

histológico de malignidad y los parámetros de captación y retención del Talio-201y del 99mTc-MIBI (Fraile y cols., 1994).

En ocasiones, cuando la técnica está disponible, se puede proceder a la fusión de imágenes estructurales y funcionales con el objetivo de establecer una correlación entre ambas y obtener así mayor información (Figura 10).



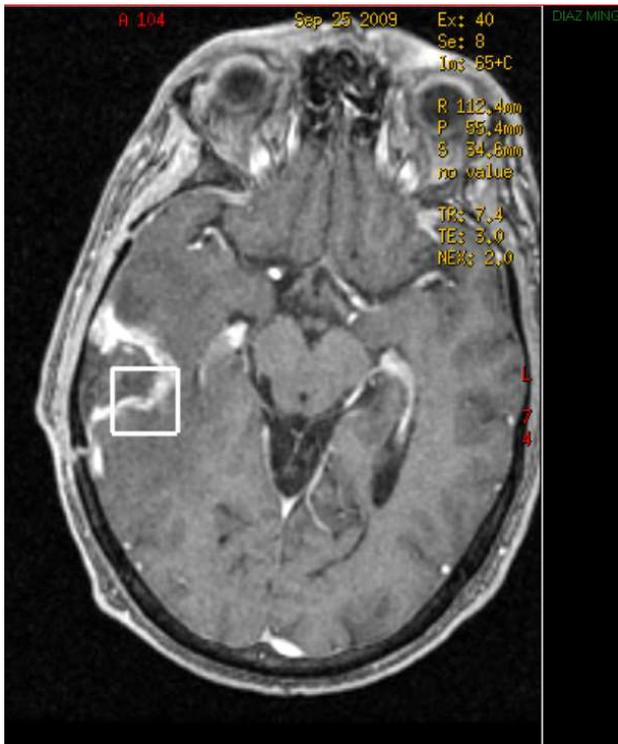


Figura 10: Foco hipercaptante a nivel de unión de tercio medio y anterior de lóbulo temporal derecho, compatible con glioma de alto grado. En las imágenes de fusión con RM se localiza sobre el lecho quirúrgico, en un área de tejido neofornativo residual en el extremo antero-inferior del lóbulo.

4.8 Tomografía por Emisión de Positrones (PET):

Ofrece información relacionada con el metabolismo tumoral. Puede contribuir a la diferenciación entre enfermedades no específicas y entre los grados tumorales. Puede delimitar los volúmenes tumorales y es útil en la diferenciación entre los cambios inducidos por el tratamiento y la recidiva.

PET-FDG: A pesar de la amplia utilización clínica de la ^{18}F -2-fluoro-2-deoxi-D-glucosa (FDG) en oncología, este radio-fármaco dista mucho de ser la modalidad de imagen ideal en tumores cerebrales, debido a la elevada actividad de la corteza cerebral sana que capta glucosa, lo que dificulta la delimitación tumoral y la valoración de la infiltración del tejido cerebral normal. Los gliomas de alto grado captan glucosa en grado similar o superior a la

corteza cerebral normal. Los de bajo grado presentan una captación semejante a la de la sustancia blanca normal.

Existen datos preliminares sobre su utilidad para el seguimiento del tumor, evaluación de respuesta al tratamiento y evaluación de enfermedad viable. Pero el acceso a dichas exploraciones es aún difícil en la mayoría de centros y no se están utilizando con dicha finalidad, sino en general para descartar recidivas.

4.9 Filiación histológica:

El diagnóstico definitivo se obtiene mediante el estudio histológico del tumor y es imprescindible para plantear el tratamiento adecuado. Para ello es necesaria la obtención de una muestra de tejido, ya sea en el acto operatorio (si la cirugía es posible) o mediante biopsia estereotáxica (guiada por TC o RM), la cual es considerada actualmente como un procedimiento exacto y seguro, pues se obtiene diagnóstico positivo entre el 91 y el 98 % de los casos (Apuzzo y cols., 1988). Por otro lado, esta técnica es de menor riesgo por su poca invasividad, reduce el tiempo quirúrgico y de estancia hospitalaria, por lo que ofrece ventajas en relación a la craneotomía exploratoria para el diagnóstico de diversas lesiones cerebrales.

4.10 Diagnóstico de pseudoprogresión:

Tras el tratamiento inicial, prácticamente todos los pacientes recaen, apareciendo nuevas lesiones o aumentando de tamaño las que persistían tras la cirugía. Se había observado, que tras la radioterapia exclusiva o la quimiorradioterapia algunos pacientes experimentaban un empeoramiento clínico y en ocasiones radiológico reversible, considerándolos como progresiones clínicas y derivándolos a tratamiento paliativo exclusivo o un cambio de tratamiento a fármacos de segunda línea. Esto ha hecho que se subestime la efectividad del tratamiento de primera línea y se sobreestime la efectividad del tratamiento de segunda línea, ya que la respuesta a éste último era debido a la reversibilidad del cuadro clínico de progresión.

La pseudo progresión se define como una falsa progresión clínica o radiológica, reversible con tratamiento antiinflamatorio/antiedema y que ocurre de 1-3 meses tras el tratamiento concomitante (Brandsma y cols., 2008).

Ocurre en el 30% de pacientes. No hay ningún método radiológico útil para realizar el diagnóstico diferencial con la progresión real de enfermedad, dado que pueden aparecer, incrementos de volumen e incluso nuevas imágenes en la radiología que son debidas probablemente a los cambios en la BHE que permiten el paso de contraste y mayor captación de gadolinio.

El proceso se ha relacionado con un aumento de supervivencia para los pacientes que presentan dicha reacción al tratamiento y es más frecuente en los pacientes que presentan metilación de la enzima metilguanina-metiltransferasa (*MGMT*) (Brandes y cols., 2008). Es decir, es la expresión de la efectividad del tratamiento y por lo tanto el tratamiento adyuvante con temozolamida ha de continuar.

Debido a la dificultad para diferenciar radiológicamente el proceso de la progresión real se recomienda continuar la TMZ adyuvante como mínimo 3 meses.

5. TRATAMIENTO

Nos vamos a centrar en el tratamiento de los gliomas de alto grado, ya que son éstos el objeto de nuestro estudio.

5.1 Tratamiento sintomático:

Los síntomas más frecuentes de los tumores cerebrales son las cefaleas, las crisis comiciales, las nauseas y vómitos y la alteración del nivel de conciencia.

La cefalea suele responder bien a los analgésicos habituales y suele ceder tras la cirugía o la radioterapia. Cuando se asocia un edema significativo responde a la administración de corticoides de 2-4 veces al día., siendo recomendable administrar la mínima dosis necesaria para el control de los síntomas.

El 30% de los pacientes sufren crisis comiciales. Sólo se debe administrar medicación antiepiléptica a los pacientes que hayan presentado crisis comiciales en algún momento, ya que no existen datos que apoyen el uso profiláctico de fármacos antiepilépticos. Un metanálisis del Subcomité de Calidad Estándar de la Academia Americana de Neurología concluía que en los pacientes con tumores cerebrales primarios los fármacos antiepilépticos no eran eficaces en la prevención de la primera crisis (Glantz y cols., 2000).

5.2 Cirugía:

Siempre que sea posible el tratamiento inicial tiene que ser quirúrgico. Primero porque permite obtener un diagnóstico histológico, segundo porque es el método más rápido y efectivo para controlar la sintomatología que el efecto masa produce, tercero porque permite una mayor eficacia de la quimiorradioterapia posterior y en cuarto lugar porque en algunas series ha demostrado un modesto impacto en supervivencia.

El principal objetivo es la máxima reducción del volumen tumoral con la mínima morbilidad posible.

La importancia de la cirugía descompresiva en pacientes sintomáticos está bien establecida, pero aún existe controversia con respecto a la magnitud de la resección que debe realizarse. Lacroix y cols demostraron que una resección del 98% o mayor, sin incrementar el déficit neurológico, aumenta significativamente la supervivencia comparado con resecciones menores al 98% (13 meses vs. 8.8 meses) (Lacroix y cols., 2001). En un análisis de tres estudios prospectivos, se analizaron los datos de 645 pacientes con glioblastoma multiforme y se revisó la influencia de la extensión de la cirugía en cuanto a supervivencia (Simpson y cols., 1993). El tratamiento consistió en resección total, parcial o biopsia en el 19%, 64% y 17% de los casos. Aunque los pacientes que fueron sometidos a una resección total o parcial tuvieron una supervivencia media mayor, estadísticamente significativa, que los que recibieron biopsia sola (11.3 m y 10.4 m vs. 6.6 m); la diferencia entre resección total y subtotal no fue estadísticamente significativa.

La indicación de una biopsia estereotáxica, aunque se realiza con mínima morbilidad, debe limitarse a los casos en que la cirugía con propósito de resección amplia (subtotal o completa) esté contraindicada, fundamentalmente en tumores profundos, múltiples o situados en áreas elocuentes.

El tratamiento ideal, desde el punto de vista quirúrgico es la resección radical, si es posible macroscópicamente total, aunque nunca se puede realizar una exéresis microscópicamente total (Figura 11). Para ello se deben utilizar todas las tecnologías modernas de que se disponga. Hoy en día otras técnicas permiten precisar al máximo la localización de las zonas críticas para el paciente y sus relaciones con el tumor: la estereoataxia (o sistema de localización del tumor mediante un sistema geométrico para localizar el punto más adecuado para la biopsia), los sistemas de neuronavegación (instrumentos informáticos que fusionan las imágenes radiológicas durante la intervención para una mejor localización del tumor), el mapeo funcional cortical

intraoperatorio (que permite localizar áreas elocuentes y evitar su daño durante la intervención), la microcirugía, la ecografía intraoperatoria, etc. La cirugía es en todos los casos de gran complejidad para preservar la mayor funcionalidad al paciente. Con este objetivo el neurocirujano se ayudará de técnicas radiológicas como la tomografía axial computarizada y la resonancia magnética craneal para localizar con la mayor exactitud el tumor. La utilización de la fluorescencia intraoperatoria (usando un contraste fluorescente que es metabolizado por el tejido cerebral y que tiñe de forma diferente el tejido tumoral y el sano) permite una resección más completa, al determinar con mayor precisión los márgenes del tumor.

La cirugía lleva asociada un aumento del riesgo de complicaciones como empeoramiento de los déficits neurológicos, convulsiones, infecciones, hemorragias, pérdida de líquido cefalorraquídeo; y otras de carácter más general como pueden ser episodios trombóticos, infarto, hemorragia digestiva,... Aunque la mortalidad y el riesgo de complicaciones han mejorado en los últimos años con los avances técnicos, se evaluará en cada paciente el balance riesgo/beneficio para plantear la mejor de las opciones de tratamiento.

Se aconseja realizar un control de imagen postoperatorio antes de las 72 horas, con el fin de distinguir entre restos tumorales y cambios posquirúrgicos. La prueba de imagen ha de ser la misma con la que se hizo el diagnóstico. La propia cirugía puede provocar cambios en la imagen de la resonancia que confundan con la presencia de tejido tumoral; otras técnicas diagnósticas como la tomografía por emisión de protón único con un isótopo, el Talio 201 (SPECT-Talio 201), la resonancia con espectroscopia o la tomografía por emisión de positrones (PET), pueden ayudarnos a aclarar la existencia o no de enfermedad residual.

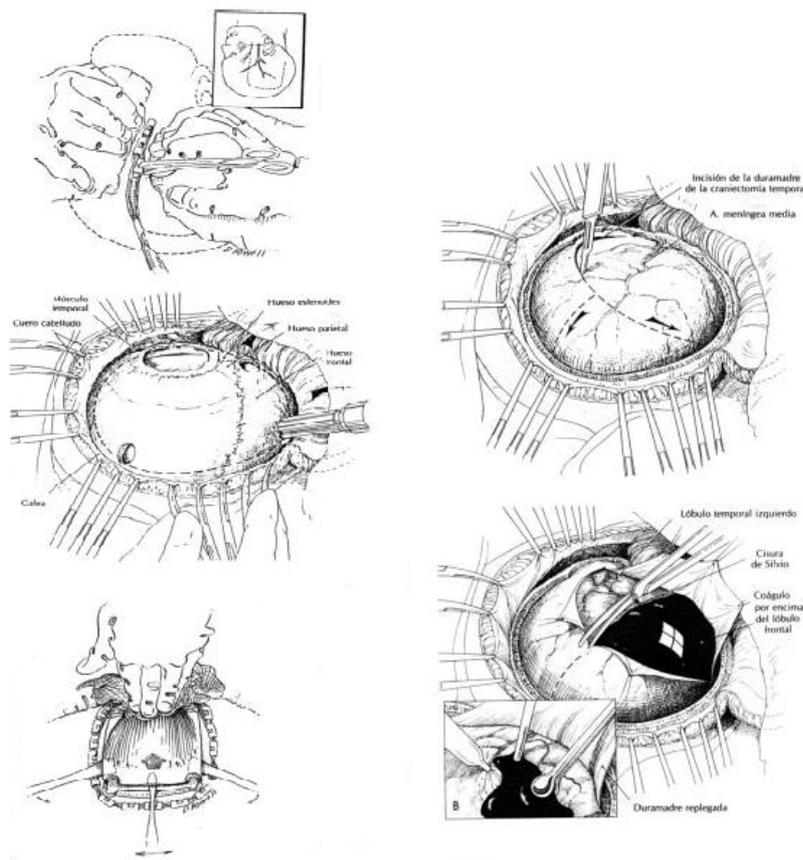


Figura 11: Ejemplo de craneotomía.

- **Tratamiento de la recaída local:**

El valor de la reintervención ha sido sugerido en un análisis retrospectivo de 168 pacientes con glioblastoma multiforme recurrente tratados en un único centro (Yung y cols., 1999); aquellos reintervenidos tuvieron una mayor supervivencia libre de progresión al año (21% Vs. 8%), supervivencia a un año (71% Vs. 15%), y a los dos años (32% Vs. 5%). Aunque esto es altamente sugerente no podemos obviar que los paciente reintervenidos fueron pacientes muy seleccionados. Los factores pronósticos más relacionados con el beneficio de la reintervención son el estado general del paciente, el volumen de la enfermedad residual, el grado histológico, el intervalo libre de recaída y el tipo de recurrencia.

5.3 Radioterapia:

Es una forma de tratamiento que consiste en el envío de partículas ionizadas de alta energía contra las células del tumor y tiene como objetivo producir daños en su material genético; este daño facilitará su muerte

La radioterapia puede dañar al tejido neurovascular que rodea al tumor; para minimizar este efecto se limita la dosis máxima que recibirán y se realiza un fraccionamiento diario de la dosis total a recibir durante varios días o semanas. Los oncólogos radioterápicos, con la ayuda de radiofísicos establecerán en base al TAC la planificación del tratamiento.

La eficacia de la radioterapia externa quedó establecida por seis ensayos fase III de la década de 1970. La radioterapia postoperatoria se convirtió en el tratamiento estándar a raíz de los resultados del estudio fase III del BTSG y SGSG (Walker y cols., 1978), en el que se comparaba el mejor tratamiento de soporte, carmustina (BCNU), radioterapia y radioterapia más carmustina después de un tratamiento quirúrgico. La supervivencia al año fue del 3% con cirugía sola, del 12% con BCNU postoperatorio, y del 24% con radioterapia postoperatoria. La radioterapia adyuvante a la cirugía incrementó la mediana de supervivencia de 14 a 36 semanas.

La radioterapia puede aplicarse mediante distintas técnicas; cada una de ellas puede tener diferentes indicaciones, según la extensión de la irradiación, la dosis que se necesita alcanzar para el control de la enfermedad y la toxicidad esperable:

- **Radioterapia externa convencional:**

Utiliza distintos haces de irradiación externa para irradiar el volumen tumoral y minimizar la cantidad de tejido sano circundante irradiado, y con ello, la toxicidad. El tratamiento es administrado, según la dosis a alcanzar, durante varios días o semanas, recibiendo dosis diarias iguales. Durante el tratamiento

el paciente es inmovilizado con una máscara para asegurar los puntos de irradiación durante toda la terapia.

- Definición de volúmenes.

El campo de irradiación debe incluir el tumor, el edema peri tumoral y un margen de seguridad (Figura 13). La dosis total administrada es 54-60 Gy con un fraccionamiento convencional de 1.8-2 Gy por sesión. Se definen:

- GTV (Gross Tumour Volume): Volumen Tumoral macroscópico.
 - En la TAC se observa como un área hipodensa central de necrosis más un anillo de contraste.
 - En la RMN se observa como una señal híper intensa en T1 con contraste, si está ausente se puede usar la secuencia FLAIR. El edema se define como señal híper intensa en T2.
 - En pacientes operados se trata del lecho quirúrgico.
- CTV (Clinical Target Volume): Volumen Blanco Clínico. Se define como GTV o el lecho quirúrgico + 2-3 cm. de margen.
- PTV (Planning Target Volume): Volumen Blanco de Planificación. Se define como CTV + 3-10 Mm. de margen.

La posición será en supino o prono dependiendo de la localización del tumor, la cabeza se fijará con máscaras termoplásticas. Una vez inmovilizado el paciente se realizará el TAC de simulación incluyendo todo el parénquima cerebral con cortes de 3 Mm, desde 1 cm. encima del vértex hasta C2.



Figura 13: Imagen axial de planificación de un tumor cerebral.

- Órganos de riesgo.

La publicación de Emami (Tabla 4) es la que ha servido de guía práctica a la hora de realizar la prescripción de dosis en los órganos de riesgo.

Tejido SNC	TD 5/5 (Gy)	TD 50/5 (Gy)	Efectos
Cerebro			Infarto, necrosis
1/3	60	75	
2/3	50	65	
Completo	40	60	
Tronco cerebral			Infarto, necrosis
1/3	60	-	
2/3	53	-	
Completo	50-54	65	
Médula espinal			Mielitis, necrosis
5 cm.	50	70	
10 cm.	50	70	

20 cm.	47	-	
Cauda equina	60	75	
Ojo			
Retina	50	65	Ceguera
Cristalino	10	18	Cataratas
Nervio óptico	50-54	65	Ceguera

Tabla 4: Dosis de tolerancia de los órganos diana en la irradiación cerebral según la publicación de Emami (Emami y cols., 1991).

TD 5/5 (Gy): dosis de tolerancia mínima, es la dosis a la que ese órgano tiene una probabilidad del 5% de desarrollar una complicación severa a los 5 años.

TD 50/5 (Gy): dosis de tolerancia máxima, es la dosis a la que ese órgano tiene una probabilidad del 50% de desarrollar una complicación severa a los 5 años.

- Fraccionamiento.

Hasta el momento el tratamiento radioterápico estándar consiste en la radioterapia externa convencional, que debe comenzar a las 2-4 semanas tras la cirugía. La dosis óptima son 60 Gy, a raíz de un estudio de la MRC (Bleehen y cols., 1991), que incluía 443 pacientes con astrocitomas grado III-IV randomizados a radioterapia 60 Gy o 45 Gy, y que demostró un aumento en la supervivencia estadísticamente significativo a favor de los 60 Gy (12m Vs. 9m, $p=0.007$).

Asimismo, en un intento de mejorar el control de la enfermedad, se han utilizado distintos esquemas de fraccionamientos alterados, tanto hiperfraccionamiento, fraccionamientos acelerados, como radioterapia hipofraccionada, no habiéndose encontrado diferencias significativas respecto a radioterapia convencional.

- **Radioterapia externa estereotáxica (Radiocirugía):**

Es una irradiación externa en la que el volumen de irradiación es pequeño, sobre él se alcanzan dosis más altas en una sola sesión y se determina mediante un sistema de ejes de coordenadas colocado en el

paciente, que permite localizar con precisión el punto de irradiación. Es precisa la utilización de una maquinaria específica como puede ser el acelerador lineal, o un gammaknife (una unidad de cobalto modificada para un tratamiento multiplanar) o un ciberknife (con sistema robótico que permite delimitar mejor el área de irradiación).

La RTOG (The Radiation Therapy Oncology Group) realizó un estudio randomizado donde comparaba la radioterapia convencional con 60 Gy más BCNU, sola o precedida de un curso de radiocirugía (de 15 a 24 Gy) en 203 pacientes con glioblastoma multiforme de 4 cm. o menos, sin que incrementase el control local o la supervivencia (tasa de supervivencia a los 2 años del 22% con radiocirugía frente al 16% con RT convencional sola), por lo que este trabajo no apoya el uso de la radiocirugía como sobreimpresión tras RT estándar (Souhami y cols., 2004).

La radiocirugía es el tratamiento de elección en pacientes con gliomas de alto grado y recaídas poco voluminosas (Shrieve y cols., 1995).

- **Radioterapia intersticial o braquiterapia:**

Consiste en la implantación dentro del tejido tumoral de catéteres que son fuentes de irradiación (por ejemplo agujas de iridio 192, etc.) que alcanzan dosis terapéuticas alrededor de ellos y se evita la irradiación del tejido sano a distancia. El mayor estudio incluye 299 pacientes con astrocitomas malignos tratados con radioterapia convencional más carmustina con o sin braquiterapia intersticial (Selker y cols., 2002), la mediana de supervivencia no fue estadísticamente significativa (68 sem vs. 59 sem) además de tratarse de una técnica extremadamente compleja.

- **Terapia con haces de partículas:**

Se utilizan principalmente unas partículas llamadas protones o neutrones en centros muy especializados, puesto que es preciso un ciclotrón para generarlas, permitiendo circunscribir de forma más precisa el área de irradiación.

- **Radioterapia externa híper fraccionada:**

Es una forma de radioterapia externa en la que con un mayor número de fracciones y dosis por día, se quiere aumentar la capacidad de destrucción del tejido tumoral. Acorta el número de días de tratamiento sin provocar un compromiso sustancial de la supervivencia, disminuye el número de traslados o la estancia hospitalaria y puede ser útil en pacientes con expectativa de vida corta.

- **Radioterapia de intensidad modulada:**

Es un sistema por el cual se consigue dar dosis más altas en unas áreas del tumor y dosis más bajas en otras áreas; el objetivo es alcanzar las dosis adecuadas en todos los tejidos tumorales, con la menor toxicidad de los tejidos circundantes. Está por definir sus indicaciones y sus ventajas en casos seleccionados frente a la radioterapia externa convencional.

- **Tratamiento de la recaída local:**

La reirradiación con radioterapia convencional no es posible por la toxicidad, sin embargo en recidivas locales inoperables se puede valorar la reirradiación focal con radiocirugía o radioterapia estereotáxica, aunque la experiencia es limitada y la interpretación de los resultados está condicionada por la falta de estudios randomizados.

En una serie de 114 pacientes con gliomas malignos recurrentes tratados con radiocirugía (Combs y cols., 2005), la mediana de supervivencia

libre de progresión fue de 8.6 meses en los tumores grado 3 y de 4.6 meses en los tumores grado 4. La mediana de dosis fue 16 Gy (rango de 12 a 50 Gy) y la necrosis radio inducida se observó en el 24% de los casos.

En otra serie observacional de 101 pacientes tratados con radioterapia estereotáxica (Kong y cols., 2008), la mediana de supervivencia fue de 12 meses en los tumores grado 3 y de 8 meses en los grado 4. La supervivencia a un año fue del 65% y 23% respectivamente.

La ASTRO (American Society for Therapeutic Radiology and Oncology) publicó en el 2005 una revisión basada en la evidencia del papel de la radiocirugía y la radioterapia estereotáxica en los gliomas malignos tanto recién diagnosticados como recurrentes (Tsao y cols., 2005), y concluyen que aún no hay suficientes evidencias para extraer conclusiones.

- **Efectos secundarios:**

La radioterapia puede tener efectos secundarios que serán diferentes dependiendo del momento en el que se produzcan:

- Agudos: Aparecen horas o días tras el inicio del tratamiento y son transitorios; consisten generalmente en dolor de cabeza o empeoramiento de los déficits neurológicos. Estos efectos son producidos por aumento del edema asociado al tumor y pueden ser tratados con corticoides.
- Toxicidades diferidas tempranas: Pueden aparecer desde seis semanas hasta seis meses después de finalizar la radioterapia. Son producidas por un daño neurológico reversible y causan empeoramiento de los déficits neurológicos que se trata también con corticoides. Clínicamente es indistinguible de los cambios que se producen en el paciente cuando se produce un empeoramiento temprano del tumor, pero una respuesta favorable a los corticoides hará pensar en que el cuadro fue producido por la toxicidad de la radioterapia.

- Toxicidades tardías: Pueden aparecer años después de finalizar la radioterapia y se producen por destrucción del tejido cerebral (radionecrosis); los síntomas no siempre mejoran con los corticoides. Otro efecto indeseable tardío es el daño cognitivo que puede oscilar entre un ligero daño neurológico y una auténtica demencia. Un efecto secundario tardío muy poco frecuente es la aparición de tumores radio inducidos.

5.4 Quimioterapia local:

Con objeto de aumentar la eficacia y disminuir los efectos secundarios se han diseñado diversos métodos de administración de quimioterapia. La administración local de carmustina (BCNU) mediante un polímero biodegradable en la cavidad quirúrgica intraoperatoriamente ha demostrado un beneficio estadísticamente significativo en supervivencia (figura 14).

En 2003 Westphal y cols publicaron un ensayo aleatorizado doble ciego, en el que 240 pacientes con glioma de grado alto recién diagnosticados eran randomizados a (1). Cirugía + Placebo + RT, o (2). Cirugía + BCNU + RT (Westphal y cols., 2003). Indicó un beneficio en la supervivencia de los pacientes a quienes se les administró un polímero impregnado de BCNU implantado de manera intraoperatoria en el momento de la cirugía inicial, cuando se comparó con la del grupo tratado mediante placebo. La mediana de supervivencia fue de 13,9 meses en el grupo de tratamiento y de 11,6 en el grupo de control y la supervivencia a 1 año del 59.2% versus el 49.2%, ($p = 0,03$). En base a estos resultados la FDA aprobó en Febrero de 2003 los implantes de BCNU en gliomas malignos como tratamiento inicial.

- **Tratamiento de la recaída local:**

En caso de recaída local, siempre que sea posible ha de plantearse la reintervención, con nuevo implante de polímeros de carmustina. Esta indicación esta aprobada como resultado del estudio realizado por Brem y cols en el cual

randomizaron 222 pacientes con recidiva a RT posquirúrgica más placebo o BCNU (Brem y cols., 1995). El implante de carmustina mostró un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia (la mediana fue de 23 semanas en el brazo control y de 31 semanas en el brazo de tratamiento).

- **Indicaciones:**

Las indicaciones actuales de los implantes de carmustina son en pacientes con gliomas malignos recidivados o recién diagnosticados, con un índice de karnofski $\geq 70\%$, una edad ≤ 65 años, sometidos a una resección macroscópicamente completa, que van a recibir radioterapia posterior.

- **Contraindicaciones:**

Está contraindicado en caso de infección intracerebral activa, edema cerebral importante, lecho quirúrgico hemorrágico y en tumores profundos o irresecables o multifocales o bilaterales o situados en áreas elocuentes.

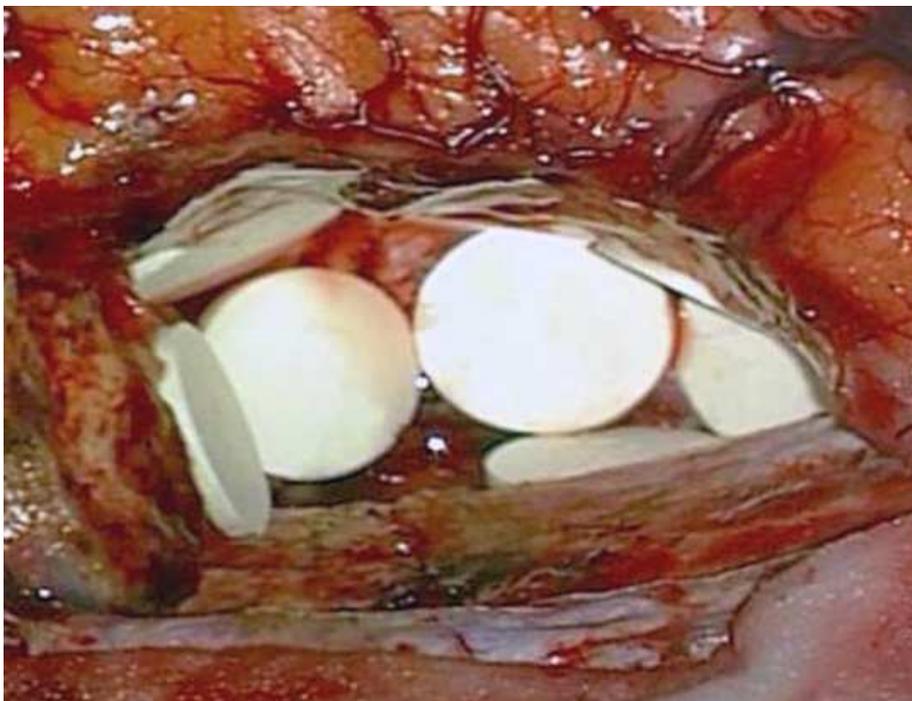


Figura 14: Implante de polímeros biodegradables de carmustina en el lecho quirúrgico.

5.5 Quimioterapia sistémica:

5.5.1 Razones para su uso:

Las principales razones que apoyan el tratamiento quimioterápico adyuvante en este tipo de tumores son:

- Se tratan de tumores parcialmente resecables en la mayoría de las ocasiones.
- La dosis de radioterapia está limitada por la toxicidad neurológica y es difícil alcanzar dosis curativas.

La principal dificultad de este tratamiento estriba en la barrera hematoencefálica, se deben usar fármacos que la atraviesen para alcanzar concentraciones adecuadas en el SNC.

5.5.2 Temozolamida:

La Temozolamida es un agente alquilante de segunda generación, de administración oral, con una buena absorción y tolerabilidad, una magnífica penetrancia en el SNC y capacidad radiosensibilizante.

Es un análogo de la mitozolomida, un profármaco que se convierte espontáneamente en el suero a pH fisiológico en su metabolito activo, la monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC). No requiere metabolismo hepático o renal, por lo que sus niveles no se ven alterados por otros fármacos inductores enzimáticos.

Sus efectos adversos más frecuentes son las náuseas y los vómitos, de carácter leve y controlables con medicación antiemética. La toxicidad limitante de dosis es la mielosupresión, que es dosis dependiente y que se recupera en 1 o 2 semanas.

La Temozolamida es un agente alquilante cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la replicación del ADN. Durante la transformación a su metabolito activo (MTIC) se produce un proceso oxidativo con formación de un inestable metildiazonio, que es rápidamente escindido en nitrógeno molecular (N_2) y un ion carbonio CH_3^+ que actúa como elemento "alquilante". Este ion carbonio provoca la metilación de algunas bases del ADN (fundamentalmente la guanina) (Figura 15). Además, en el proceso oxidativo que conduce a la activación del fármaco puede formarse otros radicales libres capaces de provocar degradación del ADN e incluso roturas cromosómicas. Conlleva a la detención de la célula en la fase G2-M, y en última instancia, a la muerte celular.

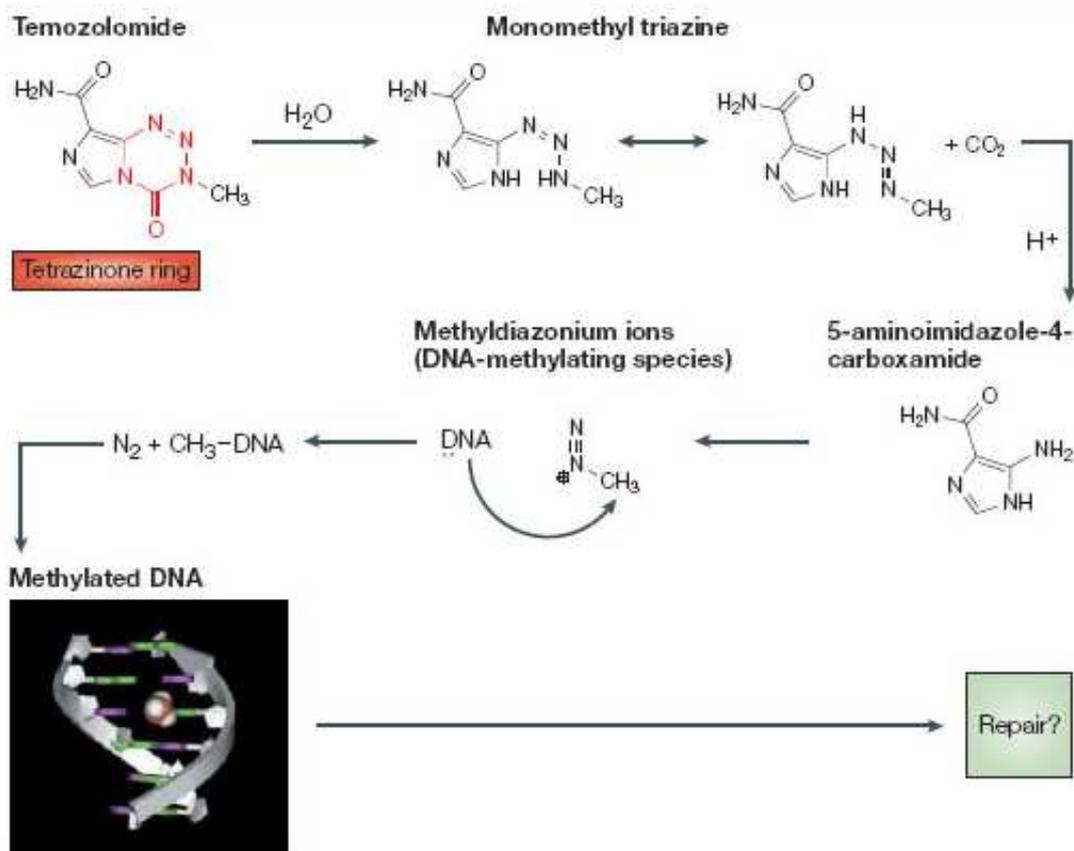


Figura 15: Mecanismo de acción de la Temozolamida.

5.5.3 Estudios de adyuvancia:

En el año 2001 el Medical Research Council (MRC) publicó los resultados del mayor estudio fase III realizado en adyuvancia de gliomas de alto grado (Medical Research Council Brain Tumor Working Party, 2001). Este estudio incluía 674 pacientes que eran randomizados a recibir radioterapia exclusiva o radioterapia más PCV (procarbazona, lomustina y vincristina). La mediana de supervivencia fue de 10 meses en el brazo de RT versus 9.5 meses en el de RT-PCV, diferencia que no fue estadísticamente significativa.

Sin embargo se han publicado dos metanálisis, que incluyen los estudios randomizados realizados en pacientes con gliomas de alto grado, que han encontrado un beneficio a favor de la quimioterapia adyuvante estadísticamente significativos.

El primero de ellos fue publicado por Fine y colaboradores en 1993 (Fine y cols., 1993) y el segundo por el GMT-Group (Glioma Meta-analysis Trialist Group) (Stewart y cols., 2002). Este último incluía 12 estudios con 3000 pacientes aproximadamente cuyo tratamiento postoperatorio consistió en radioterapia exclusiva o radioterapia más quimioterapia. Mostró que la adición de la quimioterapia reducía el riesgo de muerte en un 15%, aumentaba la supervivencia a un año en un 6% (del 40% al 46%), y aumentaba la mediana de supervivencia en 2 meses (de 10m a 12 m). La mayoría de estos estudios usaba regímenes basados en nitrosureas.

- Glioblastoma multiforme:

Stupp y cols publicaron en el año 2005 los resultados de un estudio fase III de la EORTC/NCIC (Stupp y cols., 2005) que incluía 573 pacientes con glioblastoma multiforme los cuales eran randomizados a:

1. Temozolamida $75\text{mg}/\text{m}^2$ diaria junto a la radioterapia postoperatoria seguido de 6 ciclos de Temozolamida adyuvante $150\text{-}200\text{ mg}/\text{m}^2/\text{día}$ los días del 1 al 5 cada 28 días.
2. Radioterapia exclusiva.

El tratamiento con Temozolamida mostró un aumento en la mediana de supervivencia (de 12.1 m a 14.6 m) y de la supervivencia a los 2 años (del 10.4% al 26.5%), ambas de forma estadísticamente significativa. La toxicidad fue tolerable, con un 7% de toxicidad hematológica grados III-IV en la fase de concomitancia y un 14% en la fase adyuvante. Esto le valió la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration) en Marzo del 2005 para el tratamiento de los pacientes con glioblastoma multiforme recién diagnosticados. Estos resultados, junto con el excelente perfil de toxicidad de TMZ, confirmaron definitivamente el beneficio de la adición de la quimioterapia al tratamiento inicial en GBM y es ahora el tratamiento estándar con el que otros posibles tratamientos deben compararse.

El problema del diseño de este estudio es que no podemos diferenciar si el beneficio proviene del tratamiento concurrente con la radioterapia, del tratamiento adyuvante o de ambos juntos. Además no incluía pacientes con astrocitoma anaplásico por lo que no se pueden extrapolar los resultados a este subgrupo de pacientes.

- Astrocitoma anaplásico:

El PCV es el régimen más usado en el tratamiento adyuvante de los astrocitomas anaplásicos. En 1990 publicó un estudio fase III en gliomas de alto grado que comparaba BCNU con PCV, administrados ambos tras el tratamiento con radioterapia (Levin y cols., 1990). Encontró un aumento del tiempo hasta la progresión y de la supervivencia a favor de PCV sólo en el subgrupo de pacientes con astrocitoma anaplásico. Sin embargo el estudio anteriormente comentado del MRC no encontró diferencias significativas cuando comparó RT + PCV con RT sola postoperatoria.

Desconocemos si el AA puede beneficiarse del mismo enfoque terapéutico que el GBM. Los pacientes con AA son más jóvenes en general que los pacientes con GBM y además tienen una supervivencia superior tratados únicamente con radioterapia. Sin embargo se benefician del tratamiento quimioterápico según los resultados de los metanálisis ya

mencionados. Ello ha estimulado que se extrapolen los resultados del GBM al AA y que en algunos centros el tratamiento sea el mismo.

La RTOG ha llevado a cabo un estudio en el que compara la temozolamida con las nitrosureas (carmustina o lomustina) como tratamiento adyuvante tras la radioterapia en pacientes con astrocitoma anaplásico o gliomas mixtos recién diagnosticados (RTOG 9813). Los objetivos principales son supervivencia global y supervivencia libre de progresión. Ya se ha cerrado el reclutamiento pero aún no se han publicado resultados.

El estudio NOA-04 (Wick y cols., 2009) compara la eficacia y seguridad de la RT seguida de quimioterapia (PCV o TMZ) a la progresión versus la secuencia inversa en los pacientes con glioma anaplásico de nuevo diagnóstico. Se permitía el cruce en el momento de la progresión. El primer objetivo del estudio era el tiempo hasta el fallo terapéutico (TTF) y los objetivos secundarios supervivencia global (SG), supervivencia libre de progresión (SLP), toxicidad y calidad de vida. También se analizó la significación clínica de la delección 1p/19q o la hipermetilación del promotor MGMT en un subestudio translaccional. No hubo diferencias en TTF, SLP o SG. Tanto la co delección de 1p/19q como la metilación de MGMT predijeron una disminución del riesgo de progresión y mejor supervivencia, con independencia de la histología o del tipo de tratamiento administrado. La toxicidad hematológica fue mayor en el brazo PCV. Concluyeron que la QT adyuvante en gliomas anaplásicos grado III es igual de eficaz que la RT, que TMZ es igual de eficaz y menos tóxico que PCV, y que en este tipo de tumores todavía no hay datos para afirmar que el tratamiento combinado RT/QT sea el estándar.

A este último aspecto intentará responder varios estudios abiertos en la actualidad:

- NCCTG N0577: RT vs. RT/TMZ vs. TMZ.
- CATNON: RT vs. RT/TMZ (en este brazo hay una segunda aleatorización al finalizar el tratamiento a TMZ adyuvante o no).

- Oligodendroglioma anaplásico:

El estudio americano fase III (RTOG 9402) comparó la radioterapia sola con la radioterapia precedida de 4 ciclos de PCV neoadyuvante (Cairncross y cols., 2006). Con una mediana de seguimiento de 3 años, la mediana de supervivencia global fue similar en ambos brazos (4.7 años vs. 4.9 años, p no significativa), aunque a la progresión el 80% de los pacientes del brazo de radioterapia exclusiva recibieron tratamiento quimioterápico vs. el 29% en el brazo de tratamiento combinado. La supervivencia libre de progresión favoreció al esquema de RT más PCV neoadyuvante (1.7 años vs. 2.6 años, p significativa).

El estudio europeo fase III (EORTC 26951) comparó la radioterapia sola con la radioterapia seguida de 6 ciclos de PCV adyuvante (Van den Bent y cols., 2006). Con una mediana de seguimiento de 5 años se observó un beneficio en la supervivencia libre de enfermedad a favor del grupo de radioterapia más quimioterapia adyuvante (23m vs. 13.2m, p=0.0018). No hubo diferencias en la supervivencia global aunque a la progresión el 82% de los pacientes del brazo de RT exclusiva recibió quimioterapia (el 65% PCV). En el grupo de pacientes donde se presentó la eliminación del alelo 1p y 19q (clásicamente mejor respondedores a PCV), la mediana de supervivencia global fue muy superior a la del grupo que no presentaba esta eliminación; tanto en el brazo de RT exclusiva como en el de RT más PCV adyuvante.

Está en curso un ensayo de la EORTC que aleatoriza a los pacientes con pérdidas alélicas de 1p y 19q (protocolo EORTC 26081-22086) entre tres brazos: quimioterapia exclusiva con TMZ (sin radioterapia), el esquema de Stupp o a radioterapia exclusiva.

5.5.4 Estudios en recaída:

En 1998 (Huncharek y cols., 1998) se publicó un metanálisis sobre los resultados del tratamiento de la recurrencia con quimioterapia y tras revisar 1415 pacientes llegaron a la conclusión de que los pacientes se beneficiaban del tratamiento con quimioterapia, siendo los platinos y las nitrosureas los fármacos que mostraban mayor actividad.

- Temozolamida:

La Temozolamida ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme recidivado.

En un estudio fase II (Yung y cols., 1999) con 162 pacientes en primera recaída de astrocitoma anaplásico, éstos fueron tratados con Temozolamida (150-200 mg/m²/día los días 1-5 cada 28 días). La supervivencia libre de progresión a los 6 meses fue del 46% y la supervivencia global de 13.6m.

Este mismo autor publicó un año más tarde otro estudio fase II con 225 pacientes en primera recaída de glioblastoma multiforme (Yung y cols., 2000) que eran randomizados a Temozolamida o Procarbazina, demostrando un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia a los 6 meses (21% vs. 8%) y de la mediana de supervivencia libre de progresión (12.4 sem vs. 8.3 sem) a favor del brazo tratado con Temozolamida.

Ambos estudios han llevado a la aprobación en Europa de la Temozolamida para GBM y AA recidivados.

El estudio BR12 del Institute of Cancer Research (MRC) comparaba PCV contra Temozolamida en pacientes con gliomas de alto grado recidivado. A su vez, los pacientes que recibieron temozolamida fueron aleatorizados en 2 grupos: Temozolamida 200 mg/m²/día por 5 días cada mes (TMZ-5) o Temozolamida 100 mg/m²/día por 21 días (continua) (TMZ-21). La importancia de este estudio recae en que a pesar de que TMZ se emplea de forma habitual

en la recaída nunca ha sido comparada directamente con las nitrosureas en esta indicación. Cuando el estudio fue diseñado, TMZ junto a RT todavía no era el tratamiento estándar en la adyuvancia. Los resultados, sólo comunicados en forma de abstract en congresos (Lee SM, Brada M, Stenning S, et al. A Randomised Trial of Procarbazine, CCNU and Vincristine (PCV) VS Temozolomide (5-day or 21-day schedule) for Recurrent High Grade Glioma, MRC BR12, ISRCTN83176944), son que no hay diferencias en SLP, ni en SG. Aunque el diseño estadístico del estudio no permitiría ver pequeñas diferencias entre los esquemas de Temozolamida hubo una tendencia no significativa a peores resultados con el esquema extendido. La supervivencia media rozó la significación: 6,6 meses en TMZ-21 frente a 8,5 meses en TMZ-5, $p=0,056$. La mediana de supervivencia libre de progresión sí alcanzó la significación: 4,2 meses para TMZ-21 frente a 6,4 meses para TMZ-5, $p=0,0023$.

El problema es que la Temozolamida se usa de forma generalizada en el tratamiento adyuvante, aunque una opción es el retratamiento con ésta sobre todo en los pacientes que inicialmente habían respondido (Franceschi y cols., 2005).

- Otras opciones:

1. *Cambio de dosificación de Temozolamida:*

A pesar de que la dosis estándar de TMZ es la administración de 150-200mg/m² al día durante 5 días cada 28 días, existe experiencia en dosificaciones alternativas que aumentan la intensidad de dosis, sin aumentar la toxicidad y que ejercen su efecto a través del agotamiento de la enzima reparadora MGMT (Wong y cols., 2006), o mecanismos antiangiogénicos (Wick y cols., 2007):

- Dosificación metronómica: diaria 50mg/m²/d sin descanso (Perry y cols., 2008).
- Dosis densas: 150 mg/m² días 1-7 y 14-21 cada 28 (Wick y cols., 2007) (Wong y cols., 2006).

- Pauta extendida: 75-85 mg/m² días 1-21 cada 28 días (Brandes y cols., 2006) (Berrocal y cols., 2010). Ha sido evaluada en diferentes estudios fase II en pacientes con glioblastoma multiforme en progresión a tratamientos previos con radioterapia y agentes alquilantes (no TMZ), alcanzando tasas de respuestas objetivas entre el 9% y el 15%, estabilizaciones del 35% al 51% y SLP6 del 33% al 44%, con un perfil de toxicidad aceptable aunque con elevado número de linfopenias.

La dosificación propuesta por Perry y col. de 50mg/m²/d continua tiene la particularidad de haber sido estudiada en relación con el tratamiento previo con temozolamida en primera línea. La excelente tolerancia de la pauta continua facilitaría la combinación con otros fármacos.

2. Otros fármacos:

Antes de que TMZ tuviera indicación en primera línea de tratamiento, los fármacos de los que se consideraba que tenían cierta actividad eran la procarbazona, las nitrosureas y los platinos.

Otro agente con cierta actividad es CPT-11 (irinotecan), un inhibidor de la topoisomerasa I de ADN que ha sido probado en ensayos fase II. Su bajo peso molecular permite la penetración cerebral. Su efectividad ha sido testada en una pauta trisemanal: 350mg/m² cada 3 semanas (Raymond y cols., 2003). La estimación de SLP- 6 meses fue del 46% y la supervivencia global de 6,8 meses. También se ha estudiado la pauta semanal (Batchelor y cols., 2006) de 125mg/m² 4 semanas cada 6 semanas. La SLP-6 m fue del 56%.

El bajo perfil de toxicidad TMZ facilita la terapia de combinación y se han estudiado algunas combinaciones que parecen proporcionar cierto beneficio, con cisplatino (Brandes y cols., 2004) o con irinotecan (Gruber y cols., 2004).

Existen datos de estudios fase II no aleatorizados con esquemas de quimioterapia administrados tras la progresión en pacientes expuestos previamente a la TMZ: BCNU, BCNU con irinotecan, CPT-11 con bevacizumab,

temozolamida en otras pautas, fotomustina,... No obstante no está resuelto cual es el mejor tratamiento quimioterápico tras la recaída y se recomienda la participación en ensayos clínicos.

3. Nuevas terapias (Tabla 5):

- Antiangiogénicos:

La angiogénesis es esencial para el desarrollo y crecimiento tumoral. Antes de que un tumor pueda crecer más allá de 1-2 mm, requiere vasos sanguíneos para obtener nutrientes y oxígeno. La producción por el tumor de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) y otros factores de crecimiento provoca el estímulo angiogénico que induce la formación de nueva vascularización en y alrededor del tumor, lo que le permite crecer de forma exponencial. Las células del glioma secretan factores VEGF y las células endoteliales tumorales expresan altos niveles de sus correspondientes receptores (VEGFR-1 y VEGFR-2). Toda la vía de la angiogénesis reviste un gran interés para la terapéutica de los gliomas y es una vía emergente de nuevos tratamientos oncológicos. La necrosis propia del GBM y la hipoxia inherente a las áreas de necrosis constituyen un estímulo para desencadenar la cascada angiogénica.

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado Ig G contra el receptor de VEGF que inhibe la formación de vasos sanguíneos (Figura 15). Recientemente se ha publicado un ensayo fase II en combinación con irinotecan en 32 pacientes (23 GBM y 9 AA y OA) que habían progresado tras RT y QT. La tasa de respuestas fue del 63% y la mediana de supervivencia libre de progresión de 24 semanas (Vredenburgh y cols., 2007). Aunque la metodología de investigación no puede considerarse óptima dado que el estudio no aleatoriza frente al mejor tratamiento en segunda línea (por ejemplo nitrosurea) los resultados son tan espectaculares que han motivado la presentación de documentación en las agencias del medicamento Europea y Americana (EMEA y FDA) para su aprobación como tratamiento de segunda línea.

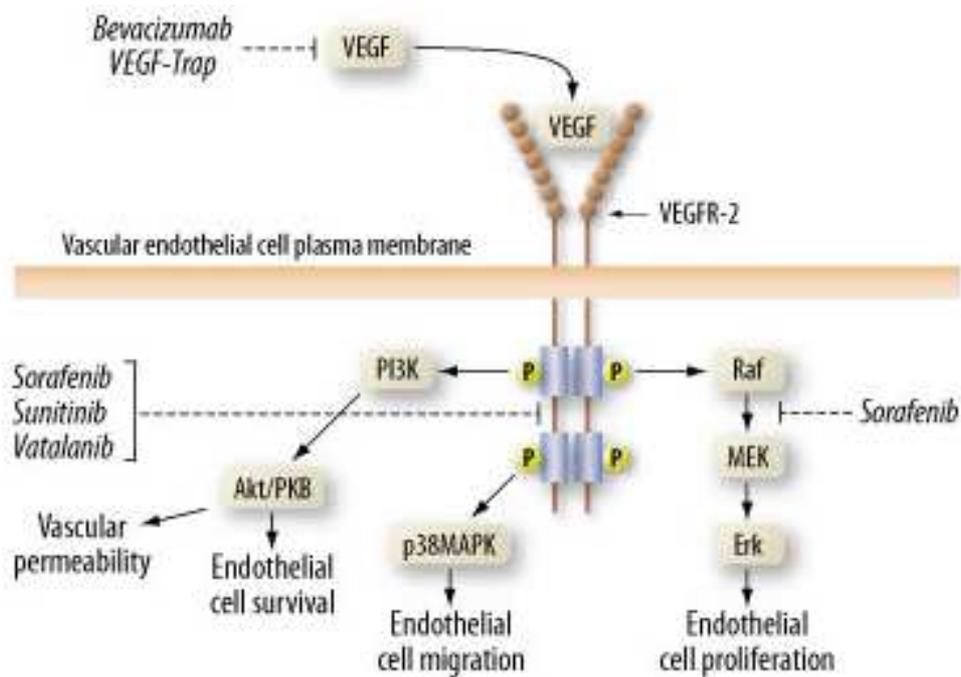


Figura 15: Mecanismo de acción de Bevacizumab.

- Tratamientos anti-diana molecular:

Como ya se ha comentado, los gliomas son ricos en alteraciones moleculares y los nuevos fármacos dirigidos a dianas terapéuticas podrían ser útiles. La primera generación de ensayos confirma la sospecha de que la inhibición de un solo objetivo probablemente no tendrá un efecto duradero antitumoral debido a las relaciones cruzadas entre las vías de transducción de señales.

Se han ensayado fármacos contra EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), ya que está sobreexpresado en el 60% de los GBM y mutado en el 50-70%. Hay estudios fase II con erlotinib (Franceschi y cols., 2007) y gefitinib (Rich y cols., 2004). La tasa de beneficio clínico ha oscilado entre el 0-47%, sobre todo estabilizaciones, pero con un tiempo hasta la progresión corto (2-3 meses).

Otro objetivo potencial es el receptor del PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas), el cual se expresa en la mayoría de los gliomas. Imatinib mesilato, un inhibidor de la PDGFR, c-kit y Bcr-Abl presentó actividad en estudios preclínicos. Como monoterapia en gliomas recurrentes no muestra actividad (Wen y cols., 2006), pero existen resultados alentadores cuando se combina con hidroxiurea (Desjardins y cols., 2007) con una SLP-6 meses del 27%, mediana de SLP de 14 semanas y 9% de respuestas por imagen.

Diana inhibida	Fármaco	Fase del estudio	Observaciones
EGFR	Cetuximab	II	Escasas respuestas
	Gefitinib	II	Respuestas cortas
	Erlotinib	II-III	¿Relación con el perfil Molecular?
	Lapatinib	I	
PDGFR	Imatinib	II	Interesante combinación con Hidroxiurea
	Sunitinib	Piloto	
	Sorafenib	I	
Inhibidores m-Tor	Temserolimus	II	Respuestas cortas
	Everolimus	I/II	
	Silormimus	I/II	
Inhibidor PKC	Enzastaurina	II/III	En fase III no mejor que CCNU
Antiangiogénicos	Bevacizumab	II/III	El más prometedor
	Cilengitide	II/III	Actividad en pacientes metilados
	AZD2171	II/III	
Inhibidor proteosoma	Bortezomib	I	

Tabla 5: Fármacos en estudio en gliomas de alto grado.

5.6 Conclusiones generales del tratamiento:

- El tratamiento inicial, siempre que se pueda, debe ser quirúrgico. El objetivo es la resección macroscópicamente completa con la mínima morbilidad posible.
- La eficacia de la radioterapia postoperatoria está bien establecida.
- Los implantes de carmustina se realizarán en pacientes con gliomas malignos recidivados o recién diagnosticados, con buen estado general, edad ≤ 65 años, resección macroscópicamente completa, que van a recibir radioterapia complementaria.
- El tratamiento adyuvante estándar en glioblastoma multiforme es el régimen de Stupp: RT con Temozolamida más Temozolamida 6 ciclos posteriores.
- El tratamiento adyuvante estándar, a día de hoy, en astrocitoma anaplásico y oligodendroglioma anaplásico es la radioterapia exclusiva o la radioterapia seguida de quimioterapia con esquema PCV.
- En la recaída valorar: reintervención, radiocirugía en recaída poco voluminosa, otros regímenes de quimioterapia.

6. FACTORES PRONÓSTICOS

6.1 Factores pronósticos relacionados con el tumor:

Estos tumores presentan una historia natural diferente según su grado de malignidad; pudiendo evolucionar durante años o ser rápidamente progresivas. De ahí la importancia de clasificarlos correctamente para poder establecer un pronóstico adecuado, y decidir la mejor estrategia terapéutica.

- Grado/tipo histológico:

Los astrocitomas difusos de alto grado de malignidad son tumores de pronóstico sombrío. Los indicadores histológicos de anaplasia de los gliomas malignos (Daumas-Duport y cols., 1988) son: la atipia nuclear, el número de mitosis, la proliferación vascular y la presencia de necrosis. Estos criterios sirven para clasificar a los gliomas malignos en cuatro grupos de creciente agresividad histológica y peor pronóstico, en la clasificación de St. Anne/Mayo. Por su parte, la OMS publicó en 1993 su clasificación de los gliomas malignos, basada en similares criterios histológicos (tabla 6). La presencia de elementos oligodendrogiales confiere un mejor pronóstico, debido a la mayor respuesta al tratamiento quimioterápico.

Grado OMS	OMS	St. Anne	Grado
I	Astrocitoma pilocítico	-	0 criterios **
II	Astrocitoma bajo grado	Astrocitoma G1 Astrocitoma G2	1 criterio
III	Astrocitoma anaplásico	Astrocitoma G3	2 criterios
IV	Glioblastoma multiforme	Astrocitoma G4	3 ó 4 criterios

Tabla 6: Equivalencia entre la clasificación de la OMS y la de St. Anne.

** Criterios de Daumas-Duport.

- Alteraciones moleculares:

- Factores de crecimiento y sus receptores: En los gliomas se ha observado sobreexpresión o amplificación génica del gen c-erb-B2, que codifica el EGFR, en el 1% de los astrocitomas de bajo grado, el 10% de los AA, y el 40% de los GBM. Diversos autores han encontrado una correlación pronóstica desfavorable en pacientes con gliomas que tienen amplificado el EGFR5; este impacto negativo en la supervivencia parece ser independiente de otros factores pronósticos, como la histopatología, la edad o el tratamiento aplicado.

- Metilación del gen promotor de la MGMT (metilguanina-metiltransferasa), como factor predictivo de respuesta a agentes alquilantes; del cual se hablará con más detalle en otro capítulo.

- Pérdidas alélicas de los cromosomas 1p y 19 q: indicadores de oligodendroglioma anaplásico, predictivos de respuesta al tratamiento quimioterápico e indicadores de buen pronóstico.

6.2 Factores pronósticos relacionados con el paciente:

- Clínica:

La duración de los síntomas previa al diagnóstico tiene valor pronóstico. Una duración prolongada de los síntomas (4-6 meses) es de mejor pronóstico.

- Edad:

La edad es un factor pronóstico independiente en los gliomas tal como se ha demostrado en diversos análisis multivariantes. En general, el pronóstico es mejor en pacientes de menos de 40 años, y empeora a partir de los 60.

- Performance Status:

El estado funcional del paciente se correlaciona con un peor pronóstico en los gliomas, al igual que sucede en otras neoplasias sólidas (Tablas 6 y 7). El pronóstico es peor en pacientes con un índice de Karnofsky < 70%. También tienen mejor pronóstico los pacientes con estado mental conservado.

ECOG	Definición
0	Asintomático
1	Restricción de la actividad intensa. Capaz de trabajo ordinario
2	Ambulatorio y capaz de autocuidados. Incapaz para trabajar. Levantado más del 50% del tiempo despierto.
3	Capaz de algún autocuidado. Vida cama-sillón más del 50% del tiempo despierto.
4	Incapacidad total. Silla-cama el 100% del tiempo despierto.
5	Muerto.

Tabla 6: Clasificación ECOG del estado funcional.

Porcentaje	Definición
100%	Normal. No hay evidencia de enfermedad.
90%	Posibilidad de llevar vida normal; ligeros signos o síntomas de enfermedad.
80%	Actividad normal con esfuerzo, algunos signos o síntomas de enfermedad.
70%	Posibilidad de cuidar de si mismo; imposibilidad de llevar una actividad normal o de realizar un trabajo activo.
60%	Requiere asistencia ocasionalmente, pero tiene posibilidades de llevar a cabo la mayoría de sus necesidades personales.
50%	Requiere asistencia y frecuentes cuidados médicos.
40%	Incapacitado; requiere asistencia y cuidados médicos especiales.
30%	Incapacidad severa; está indicada la hospitalización. No hay inminencia de muerte.
20%	Muy enfermo, es necesario hospitalizar; requiere tratamiento de sostenimiento.
10%	Moribundo. Progreso rápido fatal.
0%	Muerto.

Tabla 7: Índice de Karnofsky del estado funcional.

6.3 Factores pronósticos relacionados con el tratamiento:

- Cirugía:

El tipo de cirugía realizada tiene importancia pronóstica independiente (mejor supervivencia cuando más amplia sea la exéresis), tal como lo sugieren los trabajos de la RTOG/ECOG (Simpson y cols., 1993). Así, la supervivencia media de los pacientes con gliomas con exéresis completa ("radical") es de 11,3 meses frente a 10,4 meses si la exéresis es parcial, y tan sólo 6,6 meses si se ha practicado sólo biopsia.

- Radioterapia:

El tratamiento con radioterapia complementaria (>55Gy), es una variable pronóstica con valor independiente en estos pacientes.

Dos estudios aleatorizados del Brain Tumor Study Group (BTCG) han demostrado un aumento de supervivencia en los pacientes tratados con RT postoperatoria (Walter y cols., 1978). Se ha objetivado una relación dosis-respuesta, con un aumento de la supervivencia según se aumenta la dosis de RT hasta los 60 Gy, a partir de esta dosis, el potencial beneficio de la mayor respuesta tumoral se pierde por la aparición de toxicidad por el tratamiento.

6.4 Clasificación pronóstica:

Existen una serie de factores pronóstico que son comunes a todos los gliomas de alto grado.

- Edad (<50 años).
- I Karnofsky ($\geq 70\%$) o Performance status ≥ 2 .
- Elementos oligodendrogiales.
- Cirugía completa o parcial (versus biopsia).
- Estado cognitivo conservado (MMS > 27).
- Metilación del gen promotor de metilguanina-metiltransferasa (factor predictivo de respuesta a agentes alquilantes).

- Pérdidas alélicas de los cromosomas 1p y 19 q (indicadores de oligodendroglioma anaplásico y predictivos de respuesta al tratamiento oncológico).

En el GBM y el AA existe una clasificación pronóstica, el *Recursive partitioning* análisis (RPA) descrita por la RTOG (Scout y cols., 1998) y validada recientemente por la *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) para el GBM (Mirimanoff y cols., 2006) (Tabla 8).

Clase RPA	RTOG (AA y GBM)	EORTC (GBM)
III	Edad < 50 años, AA, estado mental anormal. O Edad < 50 años, GBM, KPS 90-100	Edad < 50 años, GBM, PS 0-1
IV	Edad < 50, GBM, KPS < 90 O Edad ≥ 50, AA, KPS 70-100 ≤ 3 meses desde primer síntoma al inicio de tto. O Edad ≥ 50, GB, Buena función neurológica, resección quirúrgica	Edad < 50, GB, PS 2 O Edad ≥ 50, GB, MMS ≥ 27, resección quirúrgica.
V	≥ 50, GB, KPS 70-100, Función neurológica que impide trabajar, Resección o sólo biopsia con radioterapia al menos 54,4 Gy O ≥ 50, GB, KPS < 70, Función neurológica normal	Edad ≥ 50, GB, MMS < 27, sólo biopsia
VI	Edad ≥ 50, PS2, Estado mental anormal. o Edad ≥ 50, PS 0-2, GB, Biopsia y menos de 54.4 Gy de RT.	-

Tabla 8: Comparación de las clasificaciones pronósticas.

7. ALTERACIONES GENÉTICAS:

La formación de glioblastomas secundarios a partir de astrocitomas de bajo grado ha permitido el conocimiento suficiente para considerar el proceso de la gliomagénesis como un proceso secuencial desde la célula precursora astrocitaria hasta el glioblastoma multiforme. En este proceso secuencial se ha reconocido que los cambios morfológicos de la transformación maligna reflejan nada más que la adquisición secuencial de alteraciones genéticas (Figura 16).

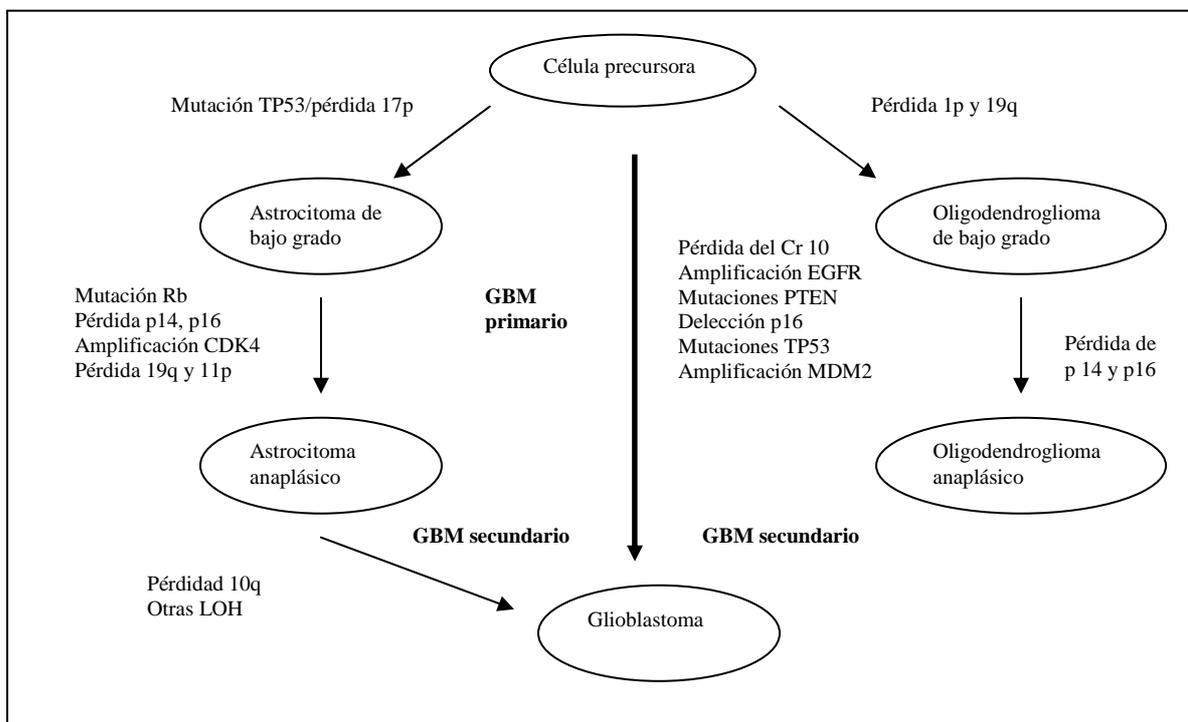


Figura 16: Esquema de los diferentes mecanismos y alteraciones moleculares más frecuentes implicadas en la génesis de un glioblastoma. (Adaptado de Franco-Hernández y cols., 2007)

7.1 Pérdida heterocigidad (LOH) del cromosoma 10:

La alteración más frecuente identificada en glioblastomas es la pérdida de heterocigidad (LOH) en 10q. En el cromosoma 10 se han identificado varios genes supresores de tumores (Ohgaki, 2005):

- *PTEN* (homólogo de la tensina y fosfatasa) en 10q23.3.
- *DMBT1* (supresor de tumores cerebrales malignos) localizado en 10q25.3-q26.1.
- *FGFR2* (receptor del factor del crecimiento fibroblástico) en la región 10q26.
- *MGMT* (O6-metilguanina-DNAmetiltransferasa), gen reparador de DNA que se localiza en 10q26.49.

Estos genes supresores de tumores intervienen en el control del ciclo celular y reparación del ADN. En glioblastomas una copia de *PTEN*, *DMBT1*, *FGFR2* y/o *MGMT* se pierde normalmente por LOH 10q y la otra copia del gen está sujeta a mutaciones o a procesos epigenéticos que lo inactivan.

7.2 Alteraciones de la vía TP53/MDM2/p14^{ARF}

Las mutaciones de TP53 aparecen en menos del 10% de los glioblastomas primarios y por el contrario están presentes en más del 65% de los glioblastomas secundarios y en el 60% de los astrocitomas anaplásicos.

El gen TP53 codifica una proteína, p53, que interviene en diferentes procesos celulares entre los que se incluyen el ciclo celular, la respuesta de las células al daño en el DNA, la apoptosis, la diferenciación celular y la neoangiogénesis. La acción de p53 es como factor de transcripción uniéndose a los promotores de genes implicados en dichos procesos. En condiciones normales p53 está unido y secuestrado por MDM2, impidiéndose la actividad transcripcional. Si aparece daño en el DNA y se libera p53 de MDM2 actúa como factor de transcripción y promueve la transcripción de otros genes implicados en reparación de DNA y/o apoptosis (Ohgaki, 2005). Si p53 no está

dañado se repara el DNA si es posible y si no la célula entra en apoptosis. Si existen mutaciones de p53 los daños del DNA no pueden ser reparados provocándose un aumento de la división celular y una disminución de la apoptosis.

Otra proteína p14^{arf} es capaz de actuar como represor de MDM2 cuando no está unido a p53 por lo que si esta proteína se altera se producirá más MDM2, que secuestrará más p53, siendo menor la reparación del DNA. La pérdida de expresión de p14^{arf} se observa con frecuencia en los glioblastomas hasta en un 76% de los casos.

7.3 Alteraciones de la vía *p16ink4/RB1/CDK4*

Otra de las vía afectadas en glioblastomas es *p16ink4/RB1/CDK4*. *RB1* (gen del retinoblastoma) se localiza en 13q14.2 y su proteína es la que controla la transición G1—S en el ciclo celular. Cuando Rb1 no está fosforilado secuestra a E2F, un factor de transcripción que activa genes implicados en la transición G1—S del ciclo celular cuando no está unido a Rb1.

La Rb1 es fosforilada por CDK4 (ciclina dependiente de la quinasa 4) y la proteína encargada de inhibir a esta ciclina es p16ink4 (inhibidor de la ciclina dependiente de la quinasa 4). La pérdida en homocigosis de *p16ink4*, y/o la amplificación de *CDK4* provoca que Rb1 esté continuamente fosforilada y no pueda unirse a E2F; al tener libre E2F éste se une al DNA junto a DP y se promueve la división celular no regulada. Estas dos alteraciones se encuentran presentes en glioblastomas (Burns y cols,1998). También se han observado cambios epigenético en este gen como la metilación de su promotor, de este modo se inactiva su expresión y aumenta la concentración de E2F libre por lo que promueve la división celular descontrolada.

Las dos vías, *p16ink4/RB1/CDK4* y *TP53/MDM2/P14arf*, están relacionadas por el elemento p21 el cual es activado por p53; p21 bloquea la CDK4 entre otras ciclinas (Figura 17). Esto desemboca en que no se fosforila la Rb1, manteniéndose inactivada E2F. En caso de mal funcionamiento de p53,

esta proteína no puede favorecer el aumento de concentración de p21, manteniéndose activa la CDK4 por lo que se fosforila la Rb1 liberando la E2F y favoreciendo la división celular descontrolada.

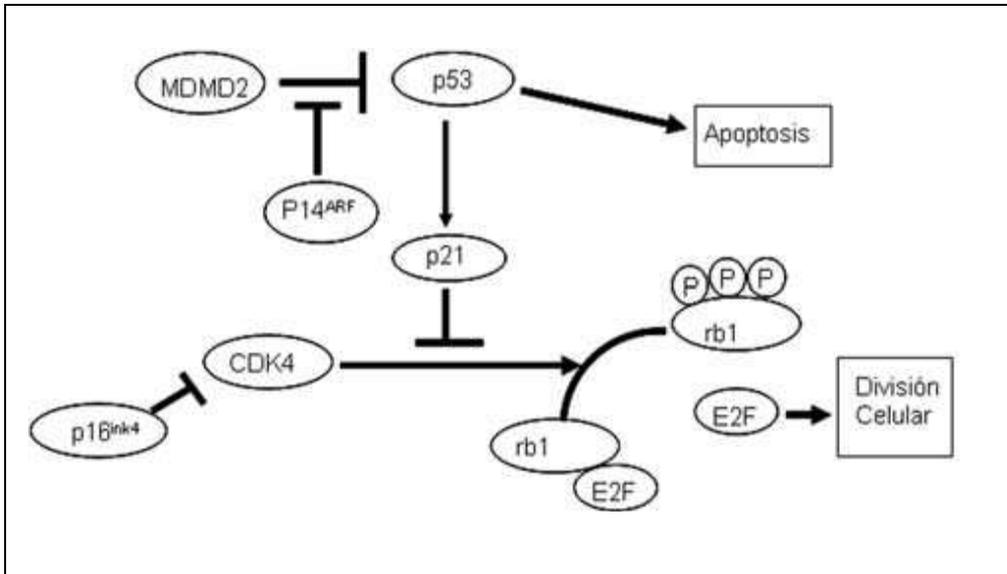


Figura 17: Conexión entre TP53/MDM2/P14arf y CDK4/ P14ink4/RB1. estas dos vías se encuentran alteradas en glioblastomas. La alteración de la vía TP53/MDM2/P14arf conlleva una disminución de la apoptosis sin embargo la alteración de la vía CDK4/P14ink4/RB1 da lugar directamente a un aumento de la división celular. (Adaptada de Franco-Hernández y cols., 2007).

7.4 Alteraciones de la vía EGFR/PTEN/Akt/mTOR

Los factores de crecimiento pertenecen a una familia de polipéptidos que se unen a sus correspondientes receptores y estimulan la proliferación y diferenciación celular, tanto en las células normales como en las malignas. Uno de los receptores de factores de crecimiento cuya unión a su ligando específico lleva a la proliferación celular es el EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) cuyo gen se encuentra en el cromosoma 7.

Una de las alteraciones genéticas presentes en glioblastomas es la amplificación del gen codificador del EGFR (Arjona y cols., 2006), que está amplificado en un 40% ó sobreexpresado en un 60% de los glioblastomas primarios mientras que esto solo ocurre en un 10% de los glioblastomas

secundarios. Esto da lugar a diferentes variantes de la proteína y provoca la síntesis de un receptor truncado y activado independientemente del ligando, por lo que la célula se divide de forma incontrolada.

7.5 Factores de crecimiento y angiogénicos:

Del resto de factores de crecimiento identificados, el más relevante en los gliomas es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y su receptor (PDGFR). Se ha comprobado que los astrocitomas coexpresan el PDGF y su receptor, hecho que no sucede en el tejido cerebral normal.

Los tumores cerebrales se cuentan entre los más vascularizados del organismo por lo que en su crecimiento necesitan mantener una constante angiogénesis. El principal mediador de la angiogénesis en los glioblastomas es el VEGF que es inducido por la hipoxia a través de HIF-1 (factor inducible por la hipoxia). Este ligando tiene varios receptores a los que se puede unir y dos de ellos el VEGFR-1 y el VEGFR-3 están sobreexpresados en las células endoteliales de astrocitomas, oligodendrogliomas anaplásicos y ependimomas.

7.6 Regulación epigenética:

En glioblastomas se han observado alteraciones epigenéticas, que se definen como aquéllas que influyen en la actividad del gen pero no implican cambios en la secuencia del ADN. La principal modificación epigenética en humanos es la metilación de la citosina localizada en los dinucleótidos CpG. Existen lugares donde son más abundantes, denominándose islas CpG. La metilación aberrante de las islas CpG produce una parada de la transcripción del gen originando su inactivación (Esteller y cols., 2002). Existen muchos genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN que pierden la expresión mediante este mecanismo.

7.7 Alteraciones moleculares del oligodendroglioma:

El hallazgo de determinadas alteraciones moleculares se considera el factor pronóstico más importante de los oligodendrogliomas. Destaca por su elevada incidencia, hasta en el 40-80% de los oligodendrogliomas, la pérdida alélica de los cromosomas 1p y 19q, que aparece combinada hasta en el 60-70% de los casos.

Los oligodendrogliomas que tienen esta alteración genética combinada presentan la apariencia histológica clásica con halo perinuclear y patrón vascular en tela metálica y se asocian con mejor pronóstico y una mejor respuesta a la quimio y radioterapia.

8. ALTERACIONES EN LAS VÍAS DE REPARACIÓN DEL ADN:

Metil-guanina-O6-metiltransferasa (MGMT).

Los fármacos más utilizados en neuro-oncología (nitrosureas, temozolamida, procarbazona) deben su efectividad a la lesión cloro-etiladora o metiladora que producen sobre el ADN.

8.1 Mecanismo de acción de MGMT.

La enzima de reparación metilguanina-O6-metiltransferasa (MGMT) repara el ADN a través de la eliminación directa de un grupo alquilo del átomo O⁶ de la guanina en el ADN de las células expuestas a agentes alquilantes. Para ello transfiere estos radicales a una cisterna interna en una reacción que inactiva de forma irreversible a una molécula de *MGMT* por cada lesión reparada (enzima suicida) (Figura 19). De este modo, la capacidad de reparación de lesiones en el ADN de una célula, depende del número de moléculas de *MGMT* y de la tasa de su síntesis de novo (Esteller y cols., 1999; Blough y cols., 2007). Este proceso es por tanto saturable y un exceso de O6-metilguanina en el ADN puede depleccionar el enzima MGMT.

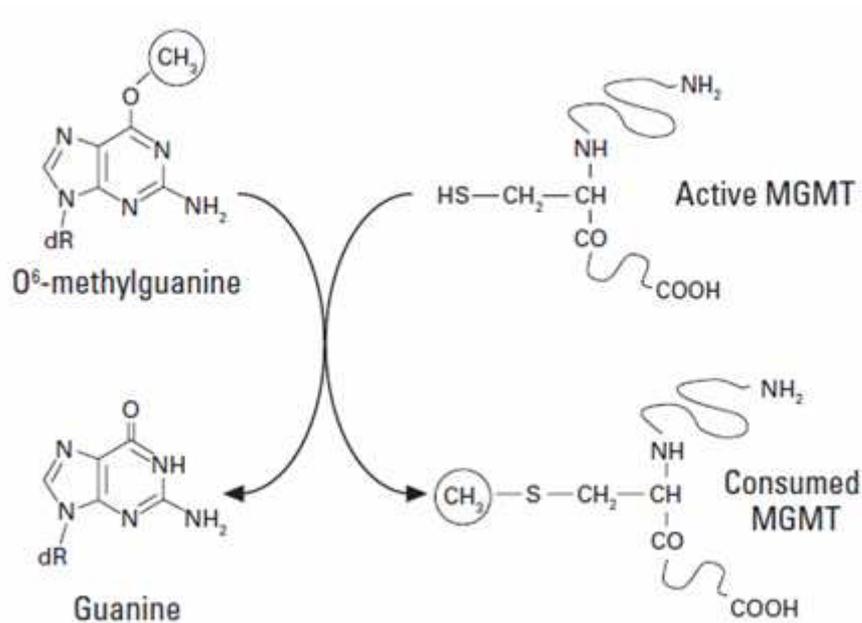


Figura 19: Mecanismo de reparación del ADN por el enzima MGMT (Adaptado de Hegi y cols., 2008).

La O⁶-metilguanina es una lesión del ADN promutagénica y carcinogénica, que se convierte en citotóxica al ser reconocidos los aductos de O⁶-metilguanina por la vía de reparación del ADN MMR (mismatch repair). El emparejamiento erróneo de la metil-guanina con la timina durante la replicación del ADN inicia ciclos de reparación inútiles que generan un ADN único y roturas en la doble hélice e induciendo la muerte celular por apoptosis (Figura 20).

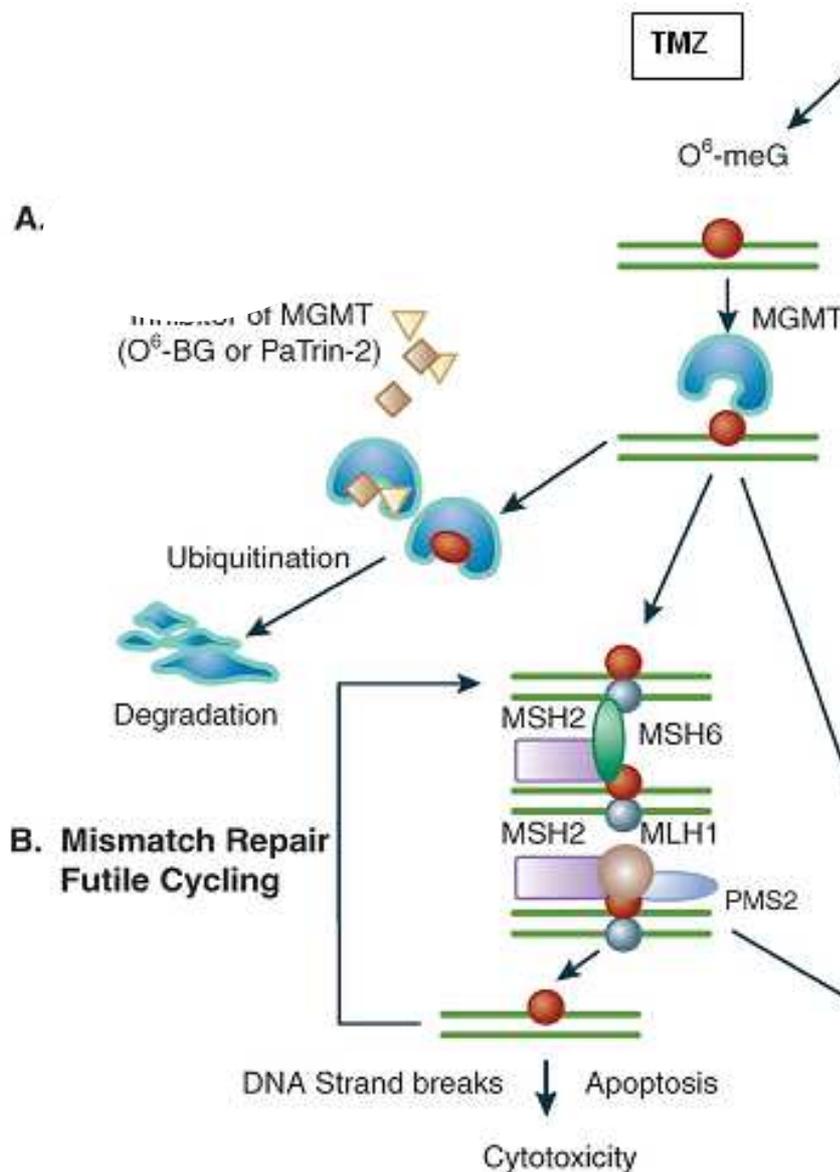


Figura 20: (A) Reparación por MGMT. (B) Inducción de apoptosis por vía MMR (Adaptado de Liu y cols., 2006).

8.2 Silenciamiento epigenético: Metilación de MGMT.

Uno de los mecanismos epigenéticos de inactivación génica consiste en la metilación aberrante de la citosina presente en sitios CpG de las islas CpG de las regiones 5' correspondientes a los promotores génicos. Las islas CpG son regiones de entre 0,5 y 2.0Kb ricas en dinucleótidos CpG, presentes en las regiones reguladoras (5') de aproximadamente la mitad de los genes humanos identificados. En el estado hipometilado de las islas CpG, los factores de

transcripción y las polimerasas pueden identificar las señales de inicio de transcripción génica. Por el contrario, la hipermetilación de las islas CpG impediría dicho proceso, inhibiendo la unión de dichos factores de transcripción, facilitando la unión de represores transcripcionales o bien induciendo cambios estructurales de la cromatina (Figura 21).

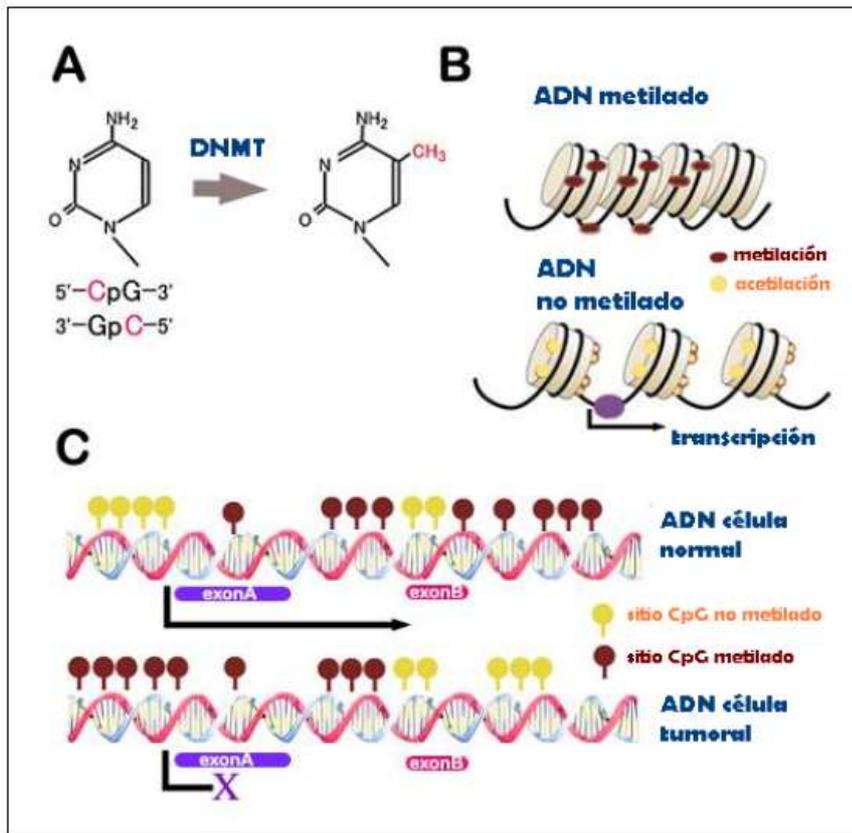


Figura 21: Representación de un gen con una isla CpG. En una célula normal la isla CpG carece de metilación, lo que permite la expresión génica. La hipermetilación en una célula tumoral impide la expresión génica.

En el gen que codifica la enzima *MGMT* existen dichos islotes dinucleótidos CpG que actúan como promotores de la codificación del gen. Si dichos islotes presentan metilación el gen es silenciado y no se produce proteína reparadora; con lo que la lesión producida por la quimioterapia en la célula tumoral se convierte en irreversible y la célula entra en apoptosis. La efectividad del tratamiento con nitrosureas es pues mejor si no hay proteína y por lo tanto si el gen *MGMT* presenta metilación del promotor.

Estas investigaciones han llevado a sugerir que la determinación de la metilación del promotor de MGMT puede ser un elemento predictivo de la respuesta al tratamiento y se puede asociar a un aumento de la supervivencia en pacientes con GBM que recibieron un agente alquilante unido a la radioterapia (Esteller y cols., 2000; Maxwell y cols., 2006); ya que la menor expresión de esta metiltransferasa impide un proceso efectivo de reparación del ADN ante el daño causado por el tratamiento con agentes citotóxicos (van den Bent, 2007).

La hipermetilación de MGMT está presente en ciertos tipos de tumores, sobre todo en gliomas y carcinomas colorrectales (Tabla 9).

Tumor	Hipermetilación MGMT
Tumores cerebrales	33%
Gliomas	38%
No gliomas	3%
Cáncer de colon	38%
Cáncer de pulmón	24%
No microcítico	29%
Microcítico	0%
Carcinoma de cabeza y cuello	28%
Linfomas	25%
Cáncer de mama	0%
Cáncer de ovario	0%
Cáncer de endometrio	0%
Leucemias	6%
Cáncer de páncreas	11%
Melanoma	11%
Carcinoma renal	8%
Cáncer vejiga	4%

Tabla 9: Hipermetilación del promotor de MGMT en tumores primarios humanos (Esteller y cols., 1999).

8.2.1 Metilación del ADN:

La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina (Salozhin y cols., 2005).

En la mayoría de los casos se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de esta manera, cuando una secuencia CpG adquiere metilación de *novo*, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal. Por otra parte, la pérdida de metilación genómica (hipometilación), como evento primario, se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la severidad de la enfermedad. (Robertson, 2005)

Los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación, como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores. Primero, la hipometilación de la heterocromatina que conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; segundo, hipermetilación de genes individuales y, finalmente hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes tumor supresores (Robertson, 2005) (Salozhin SV,2005).

La metilación de *novo* se da en las islas CpG en determinados genes de forma progresiva durante el mismo proceso de envejecimiento o en los procesos neoplásicos (figura 21). Recientemente se ha observado que existen patrones de metilación anormales en muchos tipos de cáncer, los cuales conducen principalmente a la inactivación de genes supresores de tumores y a la inestabilidad del genoma (Rodríguez y cols, 2004).

Uno de los problemas planteados en la epigenética es como se mantienen y generan todas estas metilaciones a lo largo del tiempo. Se ha comprobado que estos procesos se llevan a cabo gracias a la acción

combinada de las enzimas llamadas metiltransferasas *de novo* y de mantenimiento (Rodríguez y cols, 2004).

8.2.2 Maquinaria celular de metilación y desmetilación del ADN:

La reacción de metilación del ADN es catalizada por las ADN metiltransferasas (DNMT). La familia DNMT incluye 5 proteínas: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, y DNMT3L (tipo DNMT3).

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo en la posición C5 de las citosinas que se encuentran unidas con guaninas (CpG), en una de las cadenas de la molécula de ADN, dando lugar a la hemimetilación del ADN, obteniendo como resultado la 5-metil-citosina (5Mc). La S-adenosil metionina (SAM) es el principal donador de metilos para el ADN. Después de donar el grupo metilo, SAM se convierte en S-adenosil homocisteína (SAH) (Figura 22).

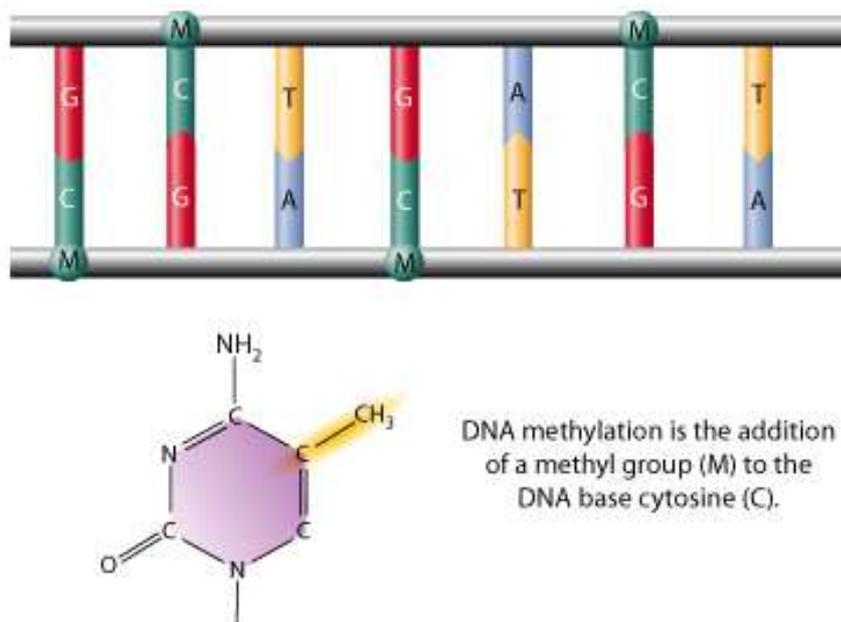


Figura 22: Metilación del ADN.

La presencia de la 5mC produce un cambio conformacional en la doble cadena del ADN, lo que actúa como señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica (Figura 23). Todo este proceso confiere una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, habiéndose demostrado que generalmente existe una correlación inversa entre los niveles de metilación del ADN y la expresión génica. (Rodríguez y col, 2004).

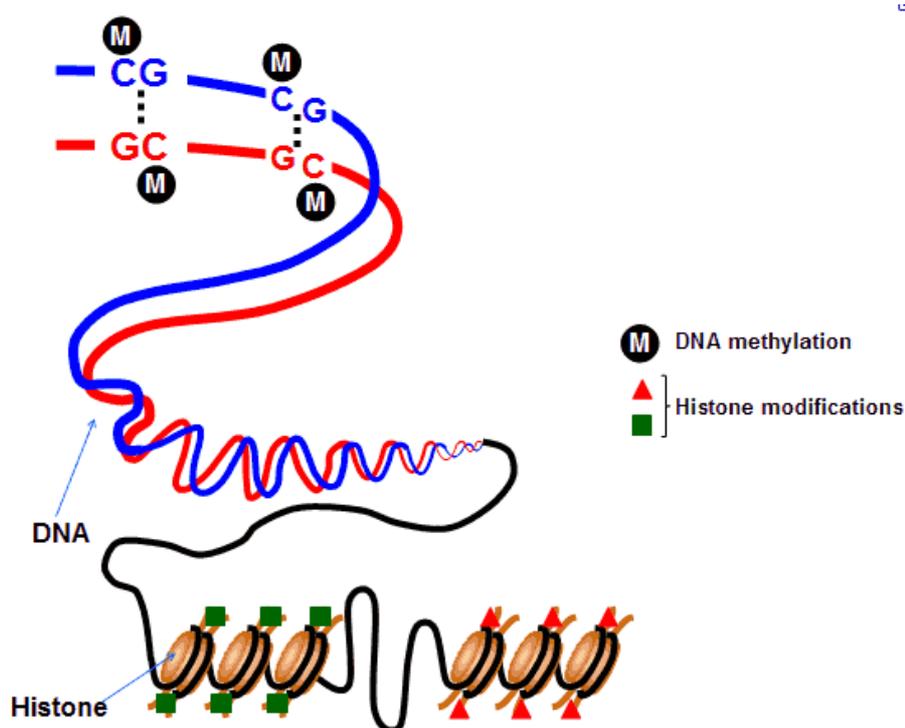


Figura 23: Modificación de la doble hélice por metilación.

8.2.3 DNMTs de mantenimiento:

Un grupo muy interesante dentro del conjunto de DNMTs son las DNMTs de mantenimiento. Estas se encargan de conservar las metilaciones a lo largo del tiempo durante el inicio de la replicación. Sólo la cadena nueva es metilada, dando lugar a la hemimetilación del ADN, y por esta razón los patrones son heredados de una manera semiconservativa y pueden ser perpetuados en la población celular (Rodríguez y cols., 2004).

8.2.4 DNMTs *de novo*:

Otro grupo importante son las DNMTs de novo. En el humano, las ADN metiltransferasas con actividad *de novo* son, DNMT3A y DNMT3B (Rodriguez y cols., 2004). Estas se encargan de adicionar grupos metilo a las islas CpG al ADN no metilado anteriormente.

8.2.5 Represión transcripcional:

Principalmente hay dos mecanismos por los cuales la metilación bloquea la transcripción:

- En primer lugar habría un efecto directo de la formación de las 5mC en las islas CpG; estas inhiben la unión de ciertos factores de transcripción en sus sitios de reconocimiento.
- El segundo involucraría a proteínas o complejos proteicos que se unen específicamente a CpG metilados y bloquean indirectamente la unión de los factores de transcripción al limitar su acceso a los elementos reguladores.

8.3 Estudios que relacionan la metilación MGMT y la respuesta a agentes alquilantes.

En un análisis retrospectivo de 47 pacientes con glioma tratados con radioterapia de holocráneo y varios agentes alquilantes, Esteller y colaboradores demostraron un incremento en los resultados clínicos en presencia de metilación del promotor del gen MGMT (Esteller y cols., 2000).

Estudios llevados a cabo en pacientes con glioblastoma mostraron que la combinación de radioterapia y BCNU/ACNU (1-(4-amino-2metil-5-pirimidinil) metil-3-(2-cloroetil)-3-nitrosourea hidrocloreto) provocaba una mayor respuesta cuando la metiltransferasa era débilmente expresada o cuando el

promotor de la MGMT se encontraba metilado (Tanaka y cols., 2003). Puesto que todos los pacientes fueron tratados con nitrosureas y radioterapia fue imposible determinar si la expresión de MGMT era un factor predictivo para la respuesta al tratamiento o simplemente un factor pronóstico.

En un estudio llevado a cabo por investigadores del CNIO se determinó el estado de metilación de las islas CpG de MGMT en 92 pacientes con gliomas que recibieron Temozolamida u otros agentes alquilantes como primera línea de tratamiento o a la recaída (Paz y cols., 2004). La hipermetilación de MGMT estaba fuertemente asociada a la presencia de una respuesta clínica completa o parcial en el tratamiento de primera línea, pero no se relacionaba con la respuesta a TMZ cuando ésta se usaba en la recaída.

Otro estudio publicado recientemente analiza lo mismo pero diferenciando los pacientes con glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico y oligoastrocitoma anaplásico en recaída. Encontraron que la metilación del promotor de MGMT se correlacionaba con un beneficio en supervivencia con el tratamiento con temozolamida en la recaída en aquellos pacientes con astrocitoma anaplásico pero no en los pacientes con glioblastomas (Sadones y cols., 2008).

8.3.1 Análisis del estudio EORTC/NCIC en GBM.

Para determinar el impacto del estatus de metilación del promotor del gen de MGMT (relacionado con la pérdida de la función de dicho gen) se analizaron los pacientes con GBM pertenecientes al estudio de la EORTC/NCIC de Stupp y cols., tratados con radioterapia +/- Temozolamida en primera línea (Hegi y cols., 2005). Se encontró la metilación del gen en el 45% de los pacientes.

La mediana de supervivencia global, independientemente del brazo de tratamiento asignado, estaba incrementada en los pacientes con metilación del gen comparados con los que no la tenían (18.2 m y 12.2 m respectivamente,

$p < 0.001$) y el 46% de los pacientes con metilación seguían vivos a los 2 años frente al 14% de los que no presentaban metilación.

Cuando se consideraba el brazo de tratamiento la metilación del promotor del gen de MGMT se relacionaba con un aumento en la supervivencia sólo en el subgrupo de pacientes tratados con Temozolamida más radioterapia (21.7 m vs. 15.3 m, $p = 0.007$). En los pacientes tratados con radioterapia exclusiva la metilación se asociaba a un ligero incremento de la supervivencia global en aquellos pacientes que sobrevivían más allá de los 9 primeros meses; probablemente esto era debido a que el 70% de ellos recibía quimioterapia a la progresión (el 60% Temozolamida) (Figura 24).

Al analizar la supervivencia libre de progresión se eliminaba el factor de confusión de la quimioterapia de segunda línea. La SLP sólo estaba prolongada en pacientes con metilación de MGMT que fueron tratados con radioterapia más Temozolamida (10.3 m vs. 5.9 m).

En el subgrupo de pacientes sin metilación de MGMT no se encontró diferencias significativas en supervivencia entre los dos brazos de tratamiento (12.7 m y 11.8 m respectivamente, $p = 0.06$). En el análisis estadístico éste fue el factor pronóstico más fuerte, incluso por encima de los tradicionales factores clínicos. Por tanto los autores concluyen que sólo se benefician del tratamiento con Temozolamida aquellos pacientes con metilación del promotor de MGMT (Figura 24).

Parece pues, que los ensayos de la actividad MGMT pueden ser predictivos para la respuesta de los glioblastomas a la terapia basada en Temozolamida, lo que origina la pregunta de si los test de expresión de MGMT podrían ser utilizados para seleccionar pacientes con glioblastoma multiforme para quimioirradiación combinada con este agente.

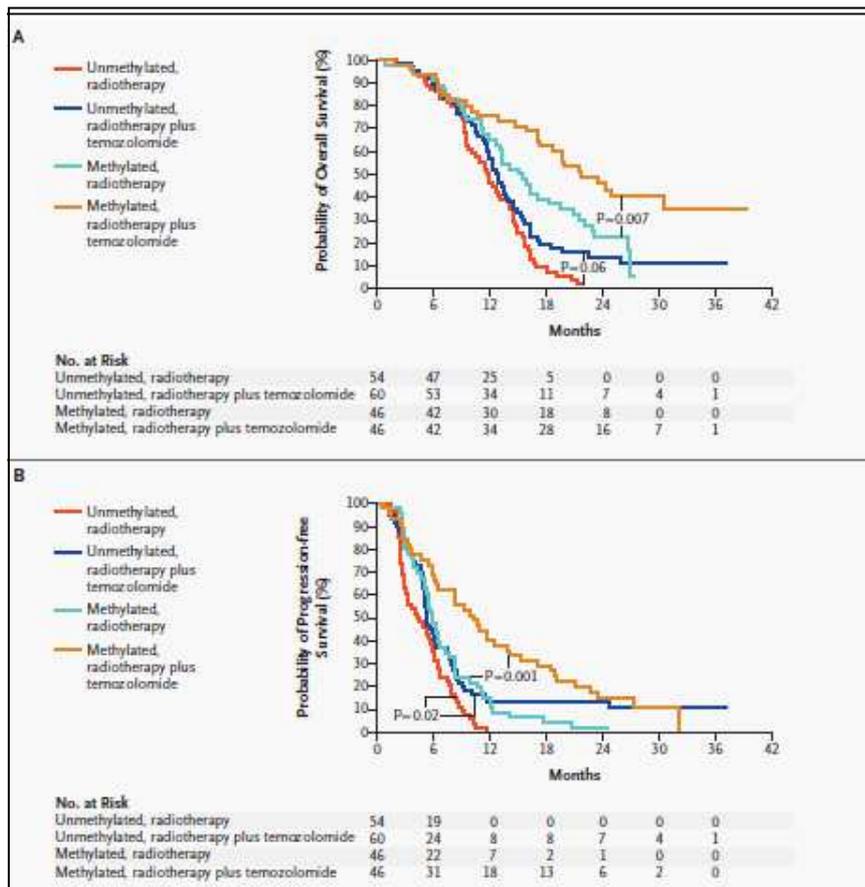


Figura 24: Supervivencia global (A) y Supervivencia libre de progresión (B) según el estado de metilación del promotor de MGMT y el brazo de tratamiento asignado (Adaptado de Hegi y cols., 2005).

8.3.2 Estudio RTOG 0525.

En la actualidad sólo un estudio clínico prospectivo se ha diseñado evaluando la metilación del gen MGMT antes de la aleatorización (RTOG0525/EORTC26052-22053). Tras cirugía y radioterapia con temozolamida diaria concurrente, los pacientes se randomizaban a recibir en la fase de adyuvancia Temozolamida dosis estándar (5 días cada 28) o un esquema extendido (21 días cada 28 durante 1 año) a fin de agotar la enzima MGMT en el tumor. El objetivo principal es supervivencia global.

8.3.3 Análisis del estudio EORTC 26951 en OA.

Se analizaron los tumores de 152 pacientes con oligodendroglioma anaplásico incluidos en el estudio europeo de la EORTC que evaluaba el papel de la RT seguida del régimen PCV adyuvante. El promotor de MGMT estaba metilado en el 80% de los casos. Fue un factor pronóstico independiente tanto en el brazo de RT como en el de RT/PCV, pero no fue un predictor de respuesta al tratamiento con PCV (van den Bent y cols., 2009).

8.4 Depleción de MGMT.

8.4.1 O6-benzilguanina:

La enzima MGMT es un blanco ideal para la modulación de su actividad, ya que es una proteína suicida, como se ha explicado anteriormente. Dado el importante rol de la MGMT en la resistencia tumoral a agentes alquilantes, una variedad de inhibidores de la MGMT está siendo investigada con la finalidad de modular la quimiorresistencia. La O6-benzilguanina (O6-BG) es un fármaco que reacciona con la MGMT por transferencia covalente del grupo benzilo a la cisterna de su región activa, lo que provoca una inactivación irreversible de la enzima y por tanto potencia el efecto de las nitrosureas. Los ensayos con este fármaco están actualmente en fase II, en pacientes con gliomas resistentes a nitrosureas.

8.4.2 Regímenes alternativos de Temozolamida:

Se podría conseguir la depleción de la MGMT en el tumor con dosis alternativas de temozolamida que produzcan una exposición más prolongada o una dosis acumulada mayor que el régimen estándar de 5 días cada 28:

- Dosificación metronómica: diaria 50mg/m²/d (Perry y cols., 2008).
- Dosis densas: 150mg/m² días 1-7 y 14-21 cada 28 (Wick y cols., 2007) (Wong y cols., 2006).
- Pauta extendida: 75-85 mg/m² días 1-21 cada 28 días (Brandes y cols., 2006) (Berrocal y cols., 2010).

8.5 Determinación analítica de MGMT.

Se han descrito diversos métodos para medir los niveles de MGMT en el tejido tumoral (Maxwell y cols., 2006):

1. Detección de la proteína MGMT en el tumor mediante inmunohistoquímica (IHQ).
2. Determinar la actividad enzimática por cromatografía líquida de alto rendimiento (CGAR).
3. Determinar el silenciamiento epigenético del gen de la MGMT por la metilación del promotor usando PCR específica de metilación (MSP).

La medida más exacta es mediante CGAR, que permite medir cuantitativamente en fentomoles, pero requiere de tejido fresco. Los análisis por IHQ revelan poblaciones tumorales heterogéneas en la expresión de MGMT, puesto que los linfocitos, la microglía y los vasos tumorales también pueden expresar niveles elevados de MGMT. La determinación de la metilación del gen promotor de MGMT mediante PCR tiene una elevada sensibilidad, requiere pequeñas cantidades de DNA y puede realizarse sobre tejido parafinado. Pero la ventaja fundamental de esta última técnica es que la detección del alelo de DNA metilado puede atribuirse solamente a las células tumorales y no a contaminación del espécimen quirúrgico por fragmentos de cerebro normal, linfocitos y vasos tumorales.

8.6 Implicaciones clínicas.

Con los datos presentes hasta el momento no se deben tomar decisiones clínicas en función del estatus de MGMT, excepto dentro de ensayos clínicos. Los resultados del estudio de Stupp y cols., deben ser reproducidos en otros estudios. La determinación de la metilación de MGMT es difícil y no está estandarizada. Además no ha sido probada la total falta de eficacia de TMZ en pacientes con tumores no metilados y la asignación de los pacientes con GBM a un tratamiento u otro en función de la metilación sólo adquirirá importancia clínica cuando se disponga de tratamientos alternativos eficaces.

9. CÉLULAS MADRE DEL GLIOMA.

Las células madres tumorales tienen tres propiedades distintivas:

- Son auto-renovables, o sea al dividirse una de las dos células hijas mantiene las mismas propiedades que la madre mediante mitosis asimétricas.
- Poseen la capacidad de desarrollar múltiples linajes celulares mediante mitosis simétricas.
- Poseen el potencial de proliferar un elevado número de veces.

Estas tres características las hacen únicas y su potencial las acerca a lo que se denomina el fenotipo maligno (Figura 25). De acuerdo a lo anterior, las células que inician un tumor llevan las tres propiedades y es así como se les llama células madres cancerosas.

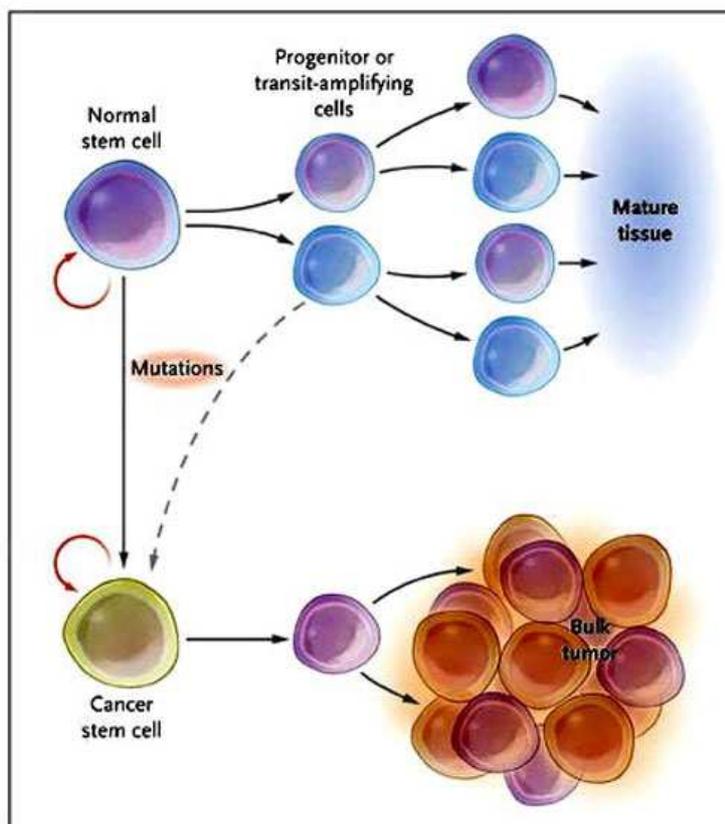


Figura 25: Sistema de células madre. Capacidad de autorrenovación (flechas curvas). Potencial para producir múltiples linajes (flechas).

El tejido normal proviene de células madres que crecen y se diferencian para crear las células progenitoras y luego la población de células maduras. Las *cancer stem cells* (CSC) son mutaciones de las células madres normales, pero también pueden provenir de las células progenitoras las cuales deben mutar y adquirir la capacidad de auto-renovación, capacidad que por el contrario está ausente en el resto de células tumorales.

Ellas pueden ser el origen de todas las unidades que componen un tumor, pueden ser la reserva quimio-resistente y las que producen recidivas o metástasis a distancia (Figura 26).

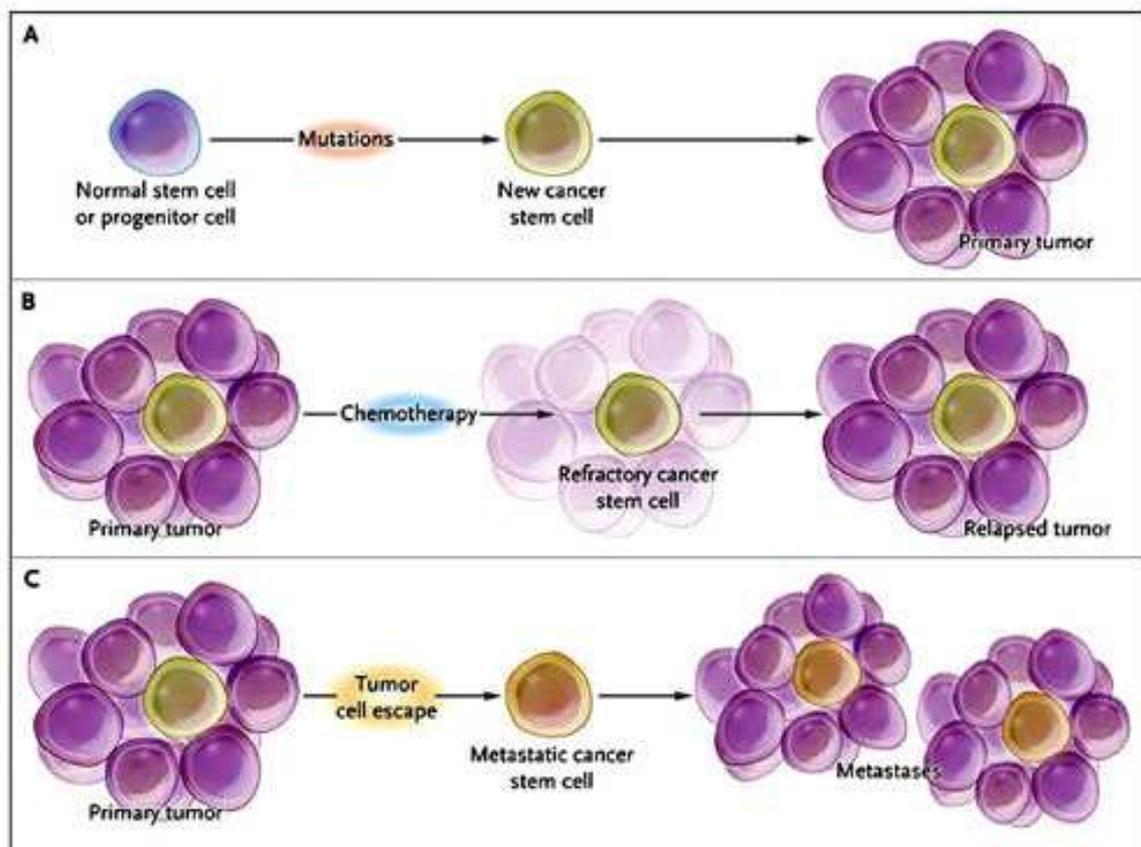


Figura 26: Escenarios que involucran células madre cancerosas.

A: mutación de una célula madre o progenitora normal.

B: destrucción de las células tumorales con quimioterapia pero persistencia de las células madre y recidiva del tumor.

C: migración de células madres y producción de metástasis.

9.1 Identificación de las CSC.

Ya en los años 90 se había descubierto que el cultivo de células del SNC en superficies no adherentes producía bolas de células llamadas “neuroesferas” con capacidad de auto-reproducción y que podían producir cualquier tipo de células cerebrales (Figura 27).

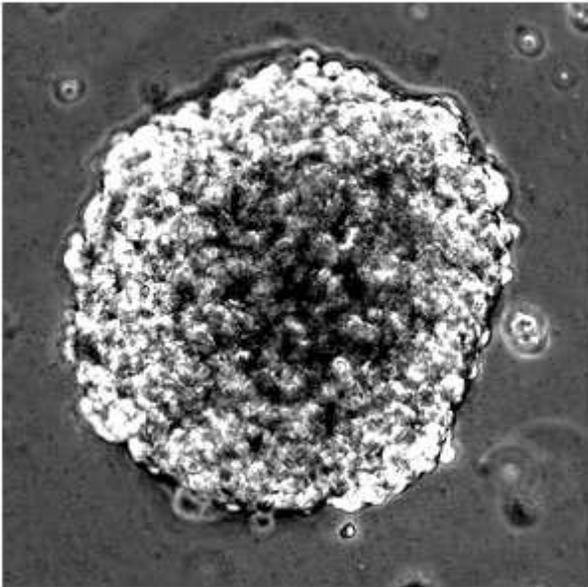


Figura 27: Neuroesfera primaria humana.

En el pasado las CSC de GBM se caracterizaban sobre la base de criterios funcionales. Últimamente se ha demostrado que las CSC tienen una proteína de superficie que puede ser detectada con un anticuerpo, el AC133 (CD133) epítipo. CD133 (prominina 1) es una glicoproteína de superficie, de 130 kD con cinco dominios transmembrana, encontrada comúnmente en células madres o progenitoras de varios tejidos, incluyendo las células madre neuronales, y en células madre de tumores gliales y de otras neoplasias. Las células madre de tumores cerebrales expresan además otros marcadores característicos de las células madre neuronales como son: nestina, sox-2, musashi-1 y bmi-1.

Shing y cols demostraron que la expresión del marcador de células madre neuronales CD133 en células tumorales era a la vez necesario y suficiente para iniciar y reproducir el tumor. Si se aislaban las células madres del SNC y se transplantaban unas 100 CD133 positivas, células de glioma humano positivas, en cerebros de ratones inmuno deprimidos se observaba la obtención de gliomas (Shing y cols., 2004), en cambio no sucedía esto si las células eran CD 133 negativas, aunque el número implantadas fuese un millón de células.

Sin embargo la sugerencia de que sólo las células CD133 positivas son capaces de reproducir el tumor en ratones inmunodeficientes se ha disputado recientemente (Beier y cols., 2007), describiendo GBM que no contienen células tumorales CD133 positivas pero en los que se han identificado CSC CD133 negativas que se asemejan en términos de diferenciación y tumorigenicidad a las CD133 positivas. Una clara separación de las células CD133 positivas y negativas es difícil técnicamente, por lo tanto el trabajo con poblaciones impuras no permiten conclusiones definitivas.

Jin y cols. (2008) han separado con éxito las células positivas para CD133 de GBM y han confirmado que éstas poseen propiedades inequívocas de células madre tumorales: forman neuroesferas, se auto renuevan y tienen capacidad de diferenciarse, como muestra el que expresen GFAP (marcador del linaje de astrocitos), y beta-tubulina (marcador de linaje neuronal).

Las células madre del glioma son consideradas responsables del inicio, propagación y recurrencia del tumor. Desde el punto de vista terapéutico el que se puedan cultivar células madres o progenitoras nos permiten suponer que estudios hechos sobre ellas nos lleven a encontrar medicamentos que las destruyan o eliminen.

- Modelos sobre el origen del cáncer:

Se han descrito múltiples oncogenes y genes supresores tumorales que participan en la iniciación y progresión tumoral. En este sentido se pueden distinguir dos posibles patrones de proliferación celular dentro del tumor:

- En el *modelo estocástico* es la célula somática la que presenta una mutación y de ella, a través de un proceso de división no controlada se van acumulando nuevas alteraciones genéticas hasta alcanzar el estado de célula tumoral. Cada célula del tumor comparte inicialmente las mismas características y puede formar nuevos tumores primarios.

- En el *modelo jerárquico* o *basado en la célula madre* sólo una pequeña subpoblación del tumor, formado por CSC, es la encargada de iniciar el proceso neoplásico, mientras que el resto de las células actúan como apoyo o representan células tumorales bien diferenciadas o terminales. Estas CSC pueden explicar la heterogeneidad celular presente en los procesos neoplásicos a partir de la diferenciación celular de las células hijas. Según este modelo, las células hijas no son capaces de generar un nuevo tumor primario.

9.2 Efecto de la Temozolamida sobre las CSC de Gliomas.

Beier y colaboradores han realizado un estudio en el que investigan el efecto de la Temozolamida en líneas celulares de *cancer stem cells* (CSC) CD133 positivas y CD133 negativas de GBM (Beier y cols., 2008). En estas líneas celulares sólo un pequeño grupo (2-4%) cumplía todos los criterios de células madre mientras que la proporción de células CD133 positivas oscilaba del 0 al 40%.

Encontraron que la Temozolamida sorprendentemente eliminaba las CSC y respetaba las células tumorales diferenciadas, siendo incapaz de inducir la muerte de las células CD133+ pero inhibiendo eficazmente su proliferación:

- Todas las líneas celulares CSC CD133+ fueron resistentes a la muerte celular inducida por TMZ a las máximas concentraciones

alcanzadas en el líquido cefalorraquídeo (5 $\mu\text{mol/L}$) y plasma (50 $\mu\text{mol/L}$) de los pacientes.

- TMZ indujo una disminución de la subpoblación de CSC CD133+ dosis y tiempo-dependiente. La incubación con concentraciones subletales de TMZ durante 2 días deplecionó completamente las CSC *in vitro* y redujo sustancialmente la tumorigénesis *in vivo* al transplantarlas en ratones inmunodeficientes.
- Redujo el metabolismo de las células CD133+ *in vitro* en un 72% después de 7 días de incubación.
- En las líneas de CSC que expresaban MGMT este efecto se produjo con concentraciones de TMZ 10 veces más altas que en las líneas que no expresaban MGMT. Así las concentraciones de TMZ que se alcanzan en los pacientes sólo es suficiente para eliminar por completo las CSC MGMT negativas *in vitro* pero no las positivas.
- También relacionaron la metilación del promotor de MGMT y la expresión de su proteína, sobre la hipótesis de que las diferencias en metilación génica y expresión proteica de MGMT en las CSC podrían ser las responsables de la depleción selectiva de las CSC de estas líneas. No hubo diferencias en metilación entre las células tumorales CD133 positivas y negativas, pero la expresión de la proteína MGMT fue mayor en las células CD133 negativas.

Los autores concluyen que la TMZ depleciona las células de glioma con propiedades de *stem cell* mientras que las células tumorales diferenciadas son resistentes. Este hallazgo contradice la hipótesis sobre las CSC.

9.3 Efecto de la radioterapia sobre las CSC de Gliomas.

Bao y colaboradores determinaron el efecto de la radiación sobre líneas celulares de gliomas y muestras quirúrgicas de pacientes. Observaron que la fracción de células CD133 positivas estaba incrementada tras el tratamiento con radioterapia. Investigaron los posibles mecanismos y encontraron que la radiación activaba la respuesta frente al daño en el DNA tanto *in vitro* como *in vivo* a través de CHK1/CHK2 (Checkpoint Kinase 1 y 2, dos serina/treoninas

quinasas que participan en los puntos regulatorios del ciclo celular), más en las células CD133 positivas que en las negativas, y por tanto la reparación del daño en el DNA inducido por la radiación era más eficaz en las células CD133+ (Bao y cols., 2006). La radio resistencia de las células CD133+ podría ser revertida con un inhibidor específico de Chk1 y Chk2, que sensibilizaría a las CSC para que fuesen dañadas por la radiación ionizante.

Recientemente Ropolo y cols. (2009) han estudiado en líneas celulares de glioblastoma la capacidad de reparación del DNA de las CSC y las células tumorales. El tiempo de duplicación estaba significativamente incrementado en las células madre en comparación con las no madres. También observaron una mayor activación de las quinasas Chk1 y Chk2 en las células CD133+ en comparación con las CD133-. Llegan a la conclusión de que la activación basal mayor de las proteínas de control del ciclo celular podrían contribuir a su radio resistencia.

9.4 Fenómenos de resistencia en CSC.

Las células madre del cáncer comparten muchas de las propiedades de las células madre normales. Éstas incluyen la resistencia a drogas tóxicas a través de la adquisición del fenotipo MDR (fenotipo de resistencia a múltiples drogas) y otros mecanismos (Figura 28):

- Posibilidad de acumular mutaciones en función de su autorrenovación.
- Poseen una alta capacidad de reparación del DNA: presentan una serie de mecanismos que contribuyen con la activación preferencial de los puntos regulatorios del ciclo celular y otras vías de activación anormal como la Wnt/ β -catenina , Notch, SHh, PTEN, BMI-1.
- Resistencia a la apoptosis: por ejemplo a través de la familia de proteínas inhibidoras de las caspasas (IAPs), como survivin y livin, que están altamente expresados en CSC (Jin y cols., 2008). Un estudio que valoró la expresión génica de BCRP1 y de la MGMT en los precursores gliales determinó una elevación significativa de su función, al igual que varios supresores de la apoptosis como el Bcl-2, FLIP, BCL-XL, y de algunos

inhibidores de proteínas proapoptóticas como el XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP y survivina (Liu y cols., 2006).

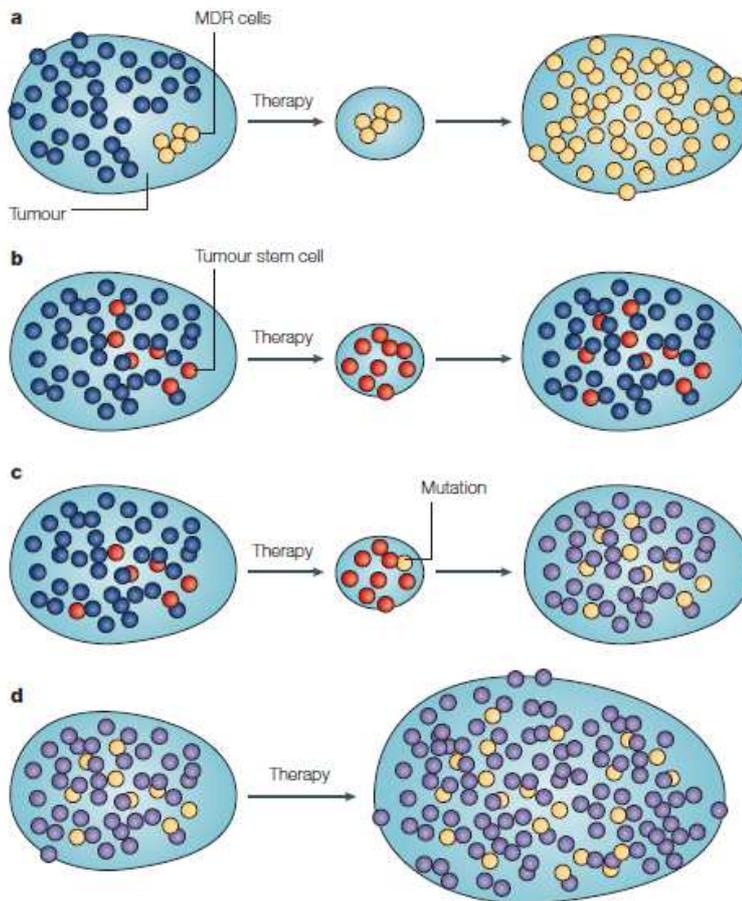


Figura 28: Modelos de fármaco resistencia tumoral (Adaptado de Dean y cols., 2005). (a) Modelo convencional: un grupo pequeño de células con alteraciones genéticas que le confieren fenotipo MDR constituye el clon resistente a la quimioterapia, que sobrevive al tratamiento y prolifera dando lugar a una recurrencia tumoral formada por células descendientes del clon resistente a fármacos. (b) Modelo de *Cancer stem cell*: el tumor contiene una pequeña población de CSC que expresa ABC transporters y que sobrevive al tratamiento, repoblando el tumor. (c) Modelo de resistencia adquirida de CSC: las células madre tumorales que expresan ABC transporters sobreviven al tratamiento y sufren mutaciones que confieren a ellas y a sus descendientes un fenotipo de resistencia a fármacos. (d) Modelo de resistencia intrínseca: tanto las células madre tumorales como las células tumorales diferenciadas son intrínsecamente resistentes al tratamiento, por tanto éste no tiene ningún efecto sobre el tumor.

- Poseen una tasa proliferativa muy baja con largos periodos de quiescencia y mayor longevidad y los agentes quimioterápicos actúan principalmente sobre las células en división.

- Fenotipo MDR: constituye la mayor causa de fallo en el tratamiento quimioterápico. Se ha asociado con la expresión de una serie de proteínas: PgP (Glicoproteína P), familia MRP y BCRP; que pertenecen a la familia ABC transporters (ATP-binding-cassette) y que se comportan como bombas de expulsión disminuyendo la concentración intracelular de distintas sustancias, entre ellas algunos fármacos antineoplásicos (Bao y cols., 2006).

9.4.1 ABC transportes:

Constituyen una superfamilia de proteínas transportadoras situadas en la membrana plasmática celular. Su estructura generalmente consta de 4 dominios: 2 dominios hidrofóbicos transmembrana y 2 dominios hidrofílicos intracelulares que contienen la bomba de ATP. Transportan sustancias en contra del gradiente de concentración a expensas de la hidrólisis de ATP. El transporte generalmente es unidireccional. Entre los sustratos de estas proteínas transportadoras se encuentran una gran variedad de compuestos: lípidos, sales biliares, péptidos, tóxicos endógenos y exógenos,...

Los ABC transporters se distribuyen por todo el organismo, pero principalmente en tejidos con importante actividad metabólica y función barrera como hígado, riñón, pulmón, tracto gastrointestinal, placenta testículo, barrera hemato-encefálica y médula ósea.

La familia ABCC o MRP (Multidrug Resistance-Associated Protein) está constituida por hasta 10 miembros diferentes (MRP1-MRP10) y previenen la acumulación de conjugados aniónicos y glutatión oxidado en el citoplasma celular (Figura 29). Juegan un papel fundamental en la defensa celular al estrés oxidativo.

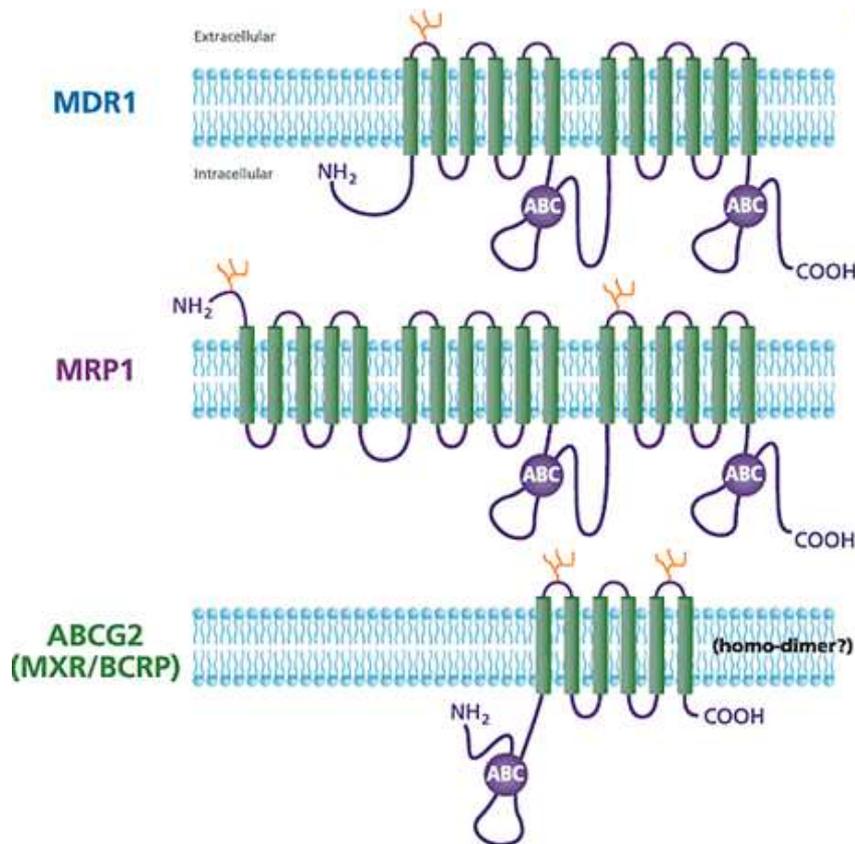


Figura 29: Estructura de los transportadores MRP y MDR1.

Se ha demostrado que MRP1 está involucrado en el fenotipo de resistencia a multidrogas en gliomas humanos. Benyahia y colaboradores evaluaron la expresión de la proteína MRP1 en 17 muestras quirúrgicas de gliomas, expresándose en todos ellos con una tinción superior al 90% de las células tumorales. También estaba fuertemente expresado en las células del endotelio vascular, sugiriendo que también puede limitar la permeabilidad de los fármacos a través de los vasos del tumor (Benyahia y cols., 2004).

Jin y colaboradores han comprobado la alta expresión de MRP1 y la baja expresión de MRP3 en CSC de gliomas CD133 positivas, además la expresión de MRP3 se incrementa a medida que las células se diferencian (Jin y cols., 2008).

9.5 Papel pronóstico.

Un estudio que incluyó 44 pacientes con glioblastoma tratados con cirugía completa o parcial seguida de quimiorradiación con temozolamida y temozolamida adyuvante, evaluó el papel pronóstico de la expresión del marcador CD133 y la capacidad del tumor para generar células CD133+ en cultivos a largo plazo (Pallini y cols., 2008).

La generación de CSC *in vitro* y la presencia de un recuento de células CD133+ $\geq 2\%$ en los tumores se correlacionó negativamente con la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión de los pacientes ($p=0,0001$ y $p=0,02$ respectivamente). En los pacientes cuyos tumores contenían células CD133+ que expresaban Ki67 se observó una muy pobre supervivencia global y supervivencia libre de progresión. Teniendo en cuenta los factores pronósticos clásicos, la generación de CSC *in vitro* y la co expresión de CD133/Ki67 resultaron ser factores pronósticos independientes altamente significativos (HR: 2,92 y 4,48 respectivamente).

9.6 Implicaciones clínicas.

El hallazgo de las CSC en gliomas sustenta la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra ellas. Las intervenciones terapéuticas dirigidas contra las CSC pueden dividirse en tres grupos:

- El primero encaminado a provocar la diferenciación de los precursores, como el ácido retinoico y los deacetiladores de histona.
- El segundo diseñado para eliminar las células progenitoras inhibiendo su multipotencialidad y quiescencia, como los anticuerpos contra CD133.
- El tercero destinado a agredir el microambiente tumoral, como los antiangiogénicos.

Objetivos

Los objetivos principales de este estudio son:

1. Determinar el estado de metilación del promotor del gen de la enzima MGMT en pacientes con gliomas de alto grado y establecer su valor como factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento.
2. Determinar el grado de expresión de la proteína MGMT en pacientes con glioma de alto grado y establecer su correlación con el estado de metilación del promotor de MGMT.
3. Determinar el valor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento de la expresión de MGMT en pacientes con gliomas de alto grado.
4. Determinar la población de células madre tumorales en pacientes con glioma de alto grado mediante la determinación de la expresión de CD133, estableciendo su correlación con otros marcadores moleculares y su valor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento.

Material y Métodos

1. MATERIALES

1.1 Población de estudio.

Se estudiaron de forma retrospectiva 78 pacientes (43 pacientes del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y 35 pacientes del Hospital Sassari de Italia), diagnosticados de gliomas de Glioblastoma Multiforme, que habían sido sometidos de forma prospectiva a tratamiento quimio-radioterápico y de los que se disponía muestras incluidas en parafina.

Los criterios específicos para la inclusión de pacientes en el estudio fueron:

- 1) Pacientes diagnosticados de glioblastoma multiforme.
- 2) Pacientes que no hubieran recibido radioterapia y/o quimioterapia previa a la obtención de las muestras a analizar.
- 3) Pacientes que recibieron tratamiento con radioterapia concurrente con Temozolamida +/- Temozolamida adyuvante en la Unidad de Oncología del H.U. Virgen de las Nieves.

1.2 Muestras de tejido cerebral tumoral.

Se analizaron las muestras de tejido tumoral incluido en parafina de toda la población de estudio. Las muestras fueron obtenidas gracias a la colaboración del Dr. Ángel Concha del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, la Dr. Anabel Sáez del que la Red de Bancos de Tumores de Andalucía y el Dr. Giovannino Massarelli del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Sassari.

Las muestras fueron procesadas para determinar, por una parte, el estado de metilación del promotor del gen de la enzima de MGMT mediante MSP y por otra el grado de la expresión de la enzima MGMT y el antígeno CD133 mediante inmunohistoquímica.

2. MÉTODOS

2.1 Determinación de la metilación de MGMT.

2.1.1 Desparafinación de las muestras.

Se partió de una cantidad de muestra media de 0,04 gramos. Todas las muestras sufrieron un preprocesamiento que consistió en la eliminación del máximo de parafina posible mediante el uso de un escalpelo. La fragmentación de la muestra dentro del tubo (usando una punta de pipeta) sirvió para aumentar la interacción entre la parafina y el xileno. Este paso de desparafinación mecánico es necesario porque la parafina interfiere en la PCR. Una vez preprocesada la muestra se aplicó el siguiente protocolo:

1. Sumergir la muestra preprocesada en 1 ml de xileno e incubar durante 45 minutos a 37°C, vorteando cada 5-10 minutos. Este paso favorece la interacción parafina-xileno en la muestra favoreciendo el proceso de desparafinado.
2. Centrifugar la muestra a máxima velocidad durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante (xileno). Se pueden llegar a observar coágulos de parafina si no se ha realizado bien el paso de desparafinado. Si es así, eliminar xileno con etanol en concentración descendente y realizar una segunda digestión con xileno. Esto puede ser debido a que el xileno no haya penetrado dentro la muestra y no se haya eliminado gran parte de la parafina. Esta tiende a formar estructuras gelatinosas observables a simple vista.
3. Resuspender el precipitado en 1 ml de etanol 100%. Dejar actuar durante 1 minuto aproximadamente. Después centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos. El tratado con etanol en concentraciones descendentes de la muestra sirve para rehidratar la muestra, debido a que previamente se había deshidratado durante el proceso de inclusión en parafina.
4. Eliminar el etanol 100% mediante centrifugado durante 5 minutos a máxima velocidad y resuspender en 1 ml de etanol al 90%. Mantener a

temperatura ambiente durante 1 minuto para el prehidratado y volver a centrifugar durante 5 minutos a máxima velocidad.

5. Eliminar el etanol al 90 % y resuspender el precipitado en 1 ml de etanol al 70%, dejar actuar durante 1 minuto y finalmente centrifugar durante 5 minutos a máxima velocidad.
6. Eliminar el etanol al 70 % y dejar evaporar durante 5 minutos hasta que todo el etanol haya desaparecido.
7. Añadir 200 microlitros de Tween 20 al 0,5%, pasar a tubo de 0,5 ml e incubar en el termociclador durante 10 minutos a 90°C y 1 minuto a 65°C. Esta segunda incubación en tween 20 favorece la eliminación de los restos de parafina que puedan haber quedado.
8. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos para eliminar tween 20.

2.1.2 Digestión del tejido desparafinado.

Continuación del protocolo:

9. Resuspender la muestra en 180 µl de buffer ATL y luego añadir 20 µl de proteinasa K. El buffer ATL proporciona a la proteinasa K su medio óptimo de actuación. La proteinasa K se encarga de la digestión enzimática del tejido durante la incubación eliminando las interacciones entre las células.
10. Incubar durante 45 minutos a 56°C y después a 28 °C de 10 a 5 minutos. Esta incubación sirve para mantener a la temperatura óptima la enzima y así actúe al máximo rendimiento.

2.1.3 Eliminación de interacciones ADN- paraformaldehído.

Continuación del protocolo:

11. Dejar enfriar durante 1 minuto, vortear y volver a incubar durante 55 minutos a 90 °C y después a 28°C entre 10 y 5 minutos. Esta incubación sirve para revertir las modificaciones del formaldehído propias de la parafina en los ácidos nucleicos. La incubación no debe superar la hora debido a que puede dar lugar a la fragmentación del DNA.

2.1.4 Extracción de ADN del tejido desparafinado. (Figura 1)

Continuación del protocolo:

12. Pasar la muestra a tubo de 1,5 ml y añadir 200 microlitros de buffer AL (buffer de lisis) y mezclar bien mediante vorteador. Después añadir 200 microlitros de etanol 100%. Vortear bien para disolver precipitado blanco. El buffer AL se encarga de lisar las células permitiendo así extraer el ADN.
13. Traspasar lisado a columna Qiamp Minielute y centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm para retener el ADN y eliminar el buffer de lisis y etanol.
14. Eliminar el eluido y añadir 500 microlitros de buffer AW1 (buffer de lavado). Dejar actuar durante 1 minuto aproximadamente para que penetre bien el buffer en la columna y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
15. Eliminar el eluido y añadir 500 microlitros de buffer AW2 (buffer de lavado). Dejar actuar durante 1 minuto aproximadamente para que penetre bien el buffer en la columna y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
16. Centrifugar a 14.000 rpm la columna con tubo recolector nuevo para eliminar los restos de etanol y secar completamente la membrana.
17.
Coger tubo de 1,5 ml sin tapa y utilizar como tubo colector (concentra mejor la muestra en el fondo del tubo) y añadir de 20-100 microlitros de buffer ATE para eluir el ADN. Dejar incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente la columna con el buffer para facilitar la elución del DNA e incrementar el rendimiento del proceso. EL buffer ATE arrastra el ADN de la columna debido a que interacciona con éste (disolvente polar); los anteriores buffers no podían arrastrarlo porque eran disoluciones apolares que no interaccionan con el ADN.
18. Conservar muestra en -20°C

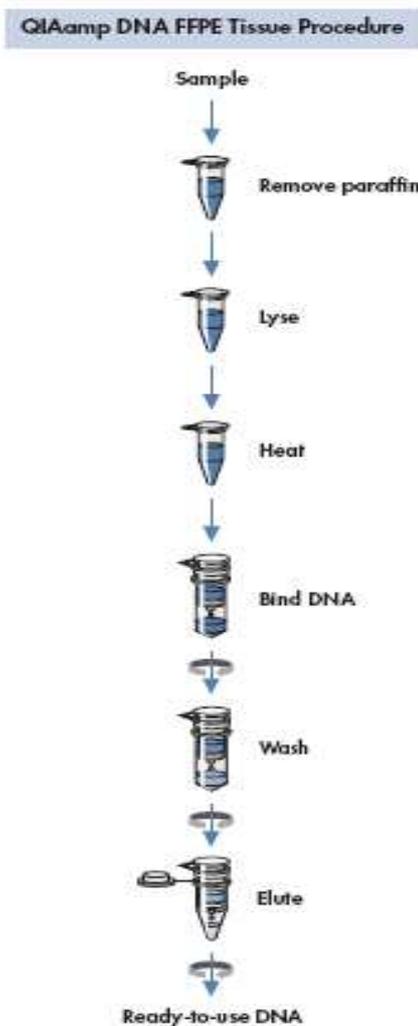


Figura 1: Extracción de DNA parafinado.

2.1.5 Pretratamiento del DNA extraído de las muestras incluidas en parafina con bisulfito sódico. .

El estado de metilación de una secuencia de ADN se puede determinar mediante el bisulfito de sodio. La incubación del ADN diana con bisulfito de sodio da lugar a la conversión de los residuos no metilados de citosina en uracilo, dejando las citosinas metiladas sin cambios (Figura 2). Por lo tanto, el tratamiento de bisulfito permite diferenciar entre las secuencias de ADN metiladas y las no metiladas.

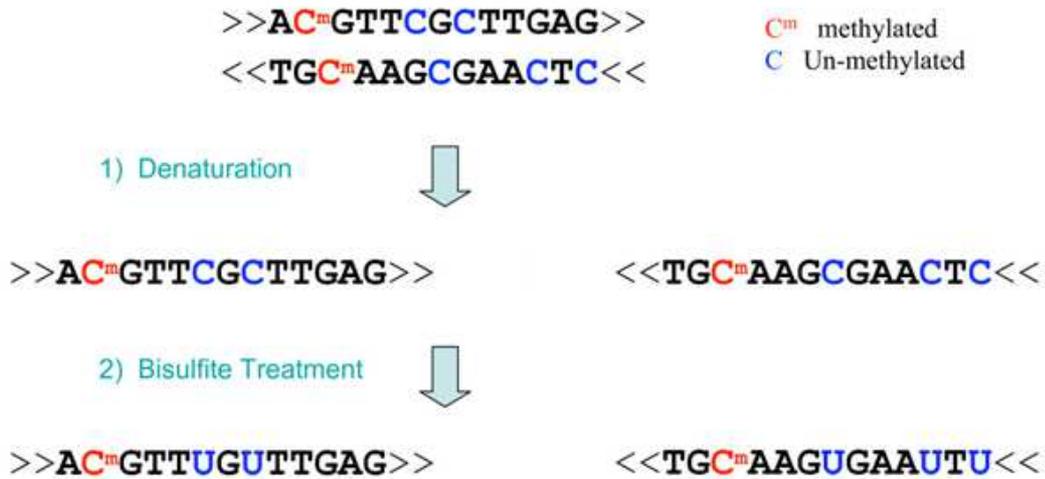


Figura 2: Determinación de la metilación mediante bisulfito.

A partir de las diferentes extracciones obtenidas anteriormente y chequeadas se realiza la conversión del DNA con bisulfito. Se partió de 2 microgramos de DNA en todas las muestras excepto las que requerían superar los 20 microlitros para llegar a esta cantidad, en ese caso se cargaban 20 microlitos. Para procesar las muestras se requiere una cantidad de ADN entre 1 ng - 2 mg de ADN en un volumen de hasta a 20 µl.

2.1.5.1. Conversión del ADN mediante bisulfito de sodio: (Figura 3)

1. Descongelar el ADN para ser utilizado en las reacciones de bisulfito. Se debe disolver las alícuotas necesarias del Mix bisulfito para procesar las muestras añadiendo 800 µl de agua libre de RNasa a cada alícuota. Vortear bisulfito hasta que la mezcla esté completamente disuelta. Esto puede tardar hasta 5 min. Si es necesario, se puede dar calor al Mix de bisulfito-agua libre de RNasa para favorecer la disolución (hasta 60 °C).

2. Preparar la reacción con bisulfito en tubos de PCR de 200 µl de acuerdo con:

Component	Volume per reaction (µl)
DNA solution (1 ng – 2 µg)	Variable* (maximum 20 µl)
RNase-free water	Variable*
Bisulfite Mix (dissolved), see step 1	85
DNA Protect Buffer	35
Total volume	140

Componentes de la reacción del bisulfito

EpiTect bisulfito Manual 09/2009

Se debe agregar cada componente en el orden indicado. Además el volumen de solución de ADN y de agua libre de RNasa debe ser de un total de 20 microlitros.

3. Cerrar los tubos de PCR y vortear la mezcla durante 15 segundos. Almacenar tubos a temperatura ambiente (15-25 °C).

El ADN Protect buffer vira de verde a azul después de su adición al ADN-bisulfito Mix, lo que indica que hay disolución suficiente y el pH es el adecuado para el conversión de bisulfito de reacción.

4. Realizar la conversión de bisulfito de ADN utilizando un termociclador.

Si se utiliza un termociclador que no permite entrar el volumen final específico (140 microlitros), poner el mayor volumen disponible.

Step	Time	Temperature
Denaturation	5 min	95°C
Incubation	25 min	60°C
Denaturation	5 min	95°C
Incubation	85 min (1 h 25 min)	60°C
Denaturation	5 min	95°C
Incubation	175 min (2 h 55 min)	60°C
Hold	Indefinite*	20°C

* Converted DNA can be left in the thermal cycler overnight without any loss of performance.

EpiTect bisulfito Manual 09/2009

5. Colocar los tubos de PCR que contiene la reacción de bisulfito en el termociclador. Hay que tener en cuenta que los termocicladores con tapa caliente son los adecuados para este procedimiento

2.1.5.2 Lavado del ADN convertido mediante bisulfito:

Continuación del procedimiento:

6. Una vez que la conversión de bisulfito se ha completado, centrifugar brevemente los tubos de PCR que contienen las reacciones de bisulfito y luego transferir el volumen completo a tubos de 1,5 ml. La transferencia de precipitados en la solución no afecta al rendimiento de la reacción.

7. Añadir 310 µl de Buffer BL recién preparado que contenga 10 mg / ml ARN carrier para cada muestra. Mezclar las soluciones mediante vortex y realizar un centrifugado rápido durante unos segundos.

8. Añadir 250 µl de etanol 100 %. Mezclar las soluciones mediante vortex durante 15 s, y dar un breve golpe de centrífuga para eliminar las gotas del interior de la tapa.

9. Pasar las mezclas obtenidas de los pasos anteriores en columnas spin Epiect.

10. Dejar durante un minuto la columna a temperatura ambiente para que penetre bien la disolución en la columna y centrifugar a la máxima velocidad durante 1 minuto. Descartar el eluido y recuperar el tubo colector.

11. Añadir 500 µl de Buffer BW (tampón de lavado) a cada columna y centrifugar a máxima velocidad durante 1 min. Desechar el eluido y recuperar el tubo colector.

12. Añadir 500 µl Buffer BD (buffer de desulfonación) a las columnas e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (15-25 ° C). Si forma precipitados el buffer BD no utilizar para la columna. La botella que contiene tampón BD debe ser cerrada inmediatamente después de su uso para evitar la acidificación por dióxido de carbono del aire. Es importante cerrar las tapas de las columnas durante la incubación.

13. Centrifugar las columnas a máxima velocidad durante 1 min. Desechar el eluido y recuperar el tubo colector.

14. Añadir 500 µl Buffer BW para cada columna y centrifugar a velocidad máxima durante 1 min. Desechar el eluido y recuperar el tubo colector.
 15. Repetir el paso 14 una vez.
 16. Colocar las columnas en tubos de 2 ml sin tapa que se van a utilizar como tubos colectores del ADN tratado con el bisulfito y centrifugar las columnas a velocidad máxima durante 1 min para eliminar cualquier líquido residual.
 17. Esta recomendado incubar las columnas con la tapas abiertas en un lugar limpio 5 minutos a 56 ° C.
 18. Añadir 40 µl de Buffer EB en el centro de cada membrana. Eluir el ADN purificado por centrifugación durante 1 min a 12.000 rpm. Para aumentar el rendimiento de ADN efluente, dispensar otros 20 µl Buffer EB en el centro de cada membrana, y centrifugar durante 1 min a velocidad máxima.
- Si el ADN purificado se tiene que almacenar durante un máximo de 24 horas, se recomienda mantenerlo de 2-8 °C. Para el almace namiento de más de 24 h, se recomienda el almacenamiento a -20 °C. A -20 ° C, el ADN purificado y convertido utilizando el Kit de bisulfito EpiTect se puede almacenar al menos 3 años, sin disminución de la calidad o la conversión.

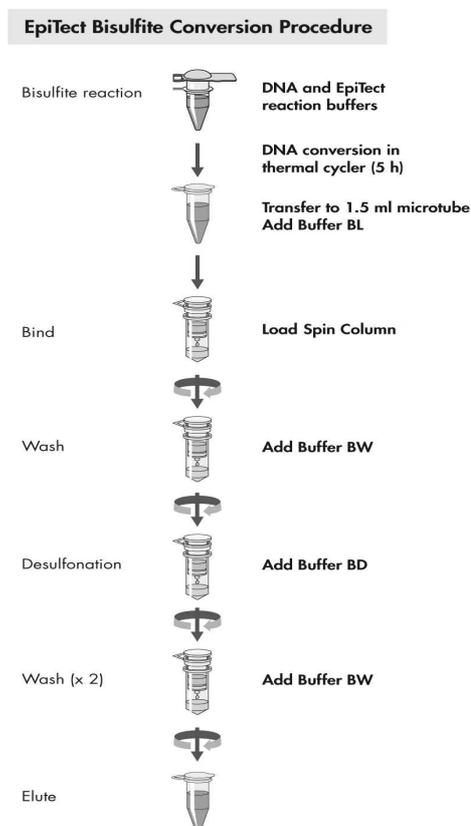


Figura 3. Conversión del DNA mediante bisulfito de sodio.

2.1.6 PCR específica de metilación (MSP).

La MSP es la técnica más utilizada para estudiar la metilación de islas CpG, que son muy comunes en los promotores de muchos genes. Las citosinas de las islas CpG se encuentran normalmente desmetiladas en tejidos normales pero se metilan en promotores de genes implicados en procesos celulares anormales como el cáncer (Esteller y cols., 2001). La PCR específica de metilación es una de las técnicas más eficaces para estudiar los perfiles de metilación de estas regiones (Herman y cols., 1996) (Figura 4).

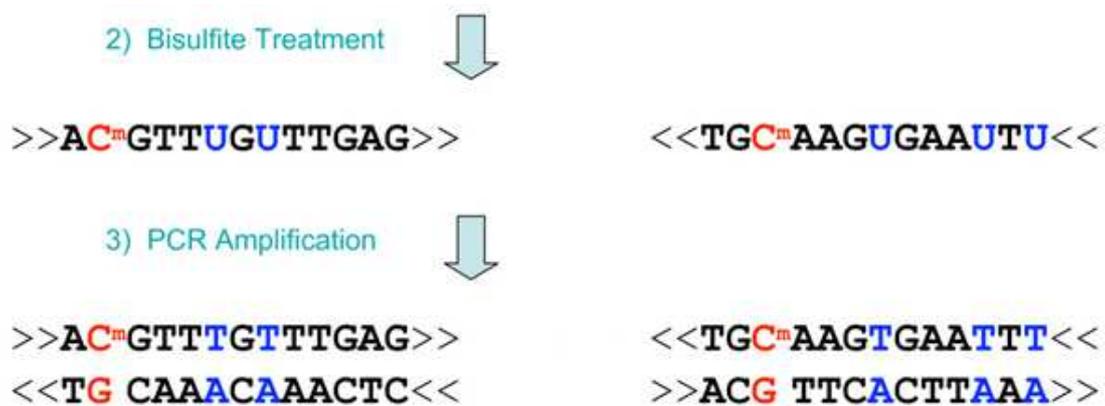


Figura 4: Amplificación de regiones metiladas.

El diseño de primers es uno de los pasos más complejos y críticos de la MSP. Las hebras de DNA modificadas con bisulfito dejan de ser complementarias por lo que se deben diseñar primers específicos para cada una. La gran sensibilidad de esta técnica permite determinar el estado de metilación de muestras pequeñas de DNA, incluyendo muestras provenientes de tejidos embebidos en parafina o microdisecionados (Herman y col. 1996). Por tanto esta técnica permite amplificar regiones metiladas específicas de DNA y visualizarlas posteriormente mediante el uso del bromuro de etidio, geles de agarosa y el transiluminador. Los primers de MGMT metilado solo amplifica MGMT metilado, los pacientes con el promotor del gen MGMT no metilado no presentarán amplificación debido a que el bisulfito sódico habrá modificado su secuencia y no se unirán los primers. Por tanto, la presencia de

un producto de PCR con el conjunto de los dos primers significa un resultado positivo para metilación.

Las PCRs se realizaron utilizando 4 µl del DNA producto del tratamiento de bisulfito con 8 µl de agua libre de RNAsas, 12,5 µl de Master Mix Green Taq y 0,5 µl de la mezcla de los primers forward y reverse para MGMT metilado usando las siguientes condiciones y primers:

- 95°C 10" ("Hot Start")
 - 95°C 30' (desnaturalización)
 - 62°C 20' (unión)
 - 72°C 30' (extensión)
 - 72°C 10" (extension final)
- } 40 ciclos

Primers para MGMT metilado

Forward 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC- 3'

Reverse 5'-GCACTCTTCCGAAAACGAAACG- 3'

El producto final del proceso de amplificación del promotor del gen de MGMT metilado tiene un tamaño de 81 pares de bases (Zheng y cols., 2009).

2.1.7 Electroforesis de Gel de Agarosa de PCR obtenidas

Las electroforesis se realizaron con geles de agarosa al 3% con bromuro de etidio a una velocidad de 75 v durante 1 hora y 15 minutos aproximadamente. Finalmente se visualizaron y fotografiaron los geles mediante el transiluminador BloRAD y el programa informático Quantity one (Figura 5).

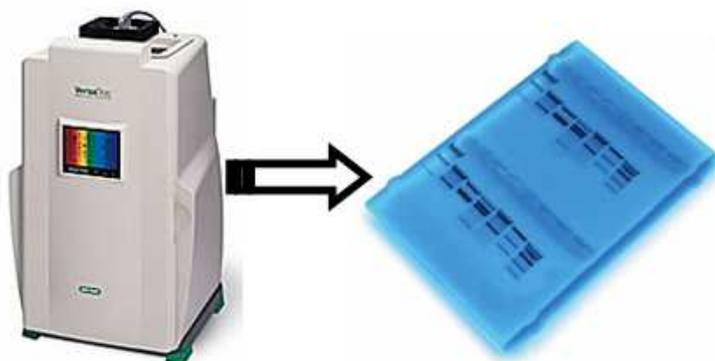


Figura 5: El sistema de BloRAD Quantity one permite una visualización y lectura fiable de las bandas de PCR que pueden ser procesadas para determinar de forma cuantitativa la intensidad de expresión de los genes analizados.

2.2 Estudio inmuno histoquímico.

2.2.1 Procedimiento y Anticuerpos.

El estudio inmuno histoquímico para la determinación de la expresión de MGMT y CD133 se realizó utilizando el sistema Bond™ Polymer Refine Detection (DS98009) en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada que utiliza una moderna tecnología de polimerización controlada para preparar anticuerpos ligadores conjugados con conjugados con peroxidasa de rábano picante polimérica (HRP). El sistema de detección evita el uso de estreptavidina y biotina, eliminando así la tinción no específica producida por la biotina endógena. El sistema está especialmente indicado para la tinción de secciones de tejido incluido en parafina y fijados con formalina con el sistema automático Bond™.

El protocolo desarrollado para llevar a cabo la tinción y determinar los niveles de expresión fue el siguiente:

1. Las muestras fueron sometidas a un lavado (solución dewax bond) a 72°C para obtener una completa (desparafinación).
2. Posteriormente fueron sometidas a un lavado con alcohol y a otra con solución de lavado.
4. Se procedió a tratamiento mediante recuperador antigénico ER1 (ph ácido) durante 20 minutos a 100°C y recuperador antigénico ER1 (ph ácido) durante 12 minutos.
6. Las muestras fueron lavadas (solución de lavado) durante 3 minutos a 35°C.
7. Las muestras fueron incubadas con peróxido de hidrógeno (10 minutos) para anular la actividad de la peroxidasa endógena.
8. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios específicos. La incubación tuvo una duración de 1 hora.

Para del estudio se emplearon dos anticuerpos (Figura 6):

- a) Anticuerpo frente a MGMT. Se utilizó en anticuerpo monoclonal MT 3.1: SC-56157 (Santa Cruz Biotecnología, Inc.) de tipo Igg1 y procedente de ratón. Se usó a una concentración 1:50.

b) Anticuerpo frente a CD133. Se utilizó el anticuerpo policlonal 19898 (Abcam), procedente de conejo. Se uso a una concentración de 1:50.

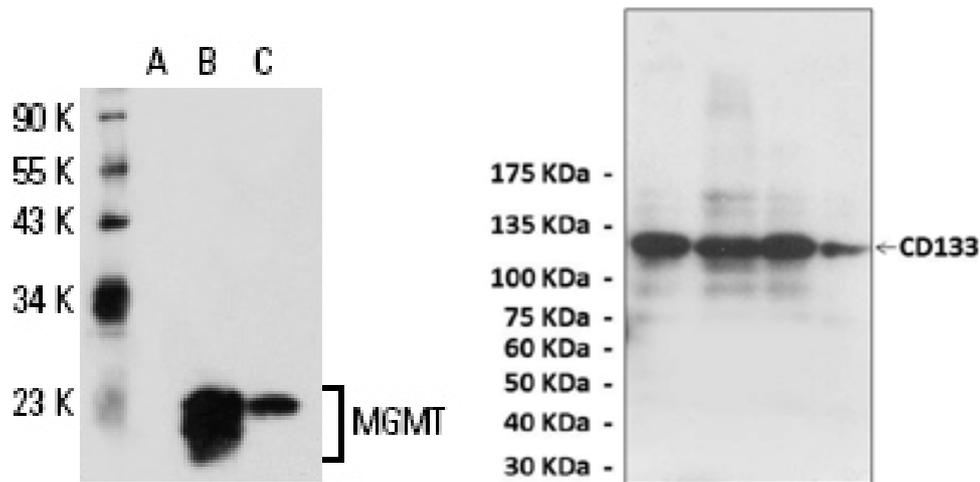


Figura 6: Los anticuerpos utilizados en el estudio reconocían de forma específica a las moléculas Cd133 y MGMT.

9. Una solución de anticuerpos post-primarios es utilizada (8 minutos) para potenciar la penetración del reactivo polimérico posterior

10. Las muestras se lavaron (solución de lavado)

11. Las muestras fueron incubadas posteriormente (8 minutos) con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón/conejo marcado con poliperoxidasa de rábano picante.

12. Las muestras se lavaron primero con solución de lavado y posteriormente con agua destilada

13. Tras un lavado, las muestras fueron incubadas (6 minutos) con el sustrato cromógeno (3,3'-diaminobenzidina o DAB), se permite la visualización mediante una tinción caracterizada por un precipitado marrón.

14. Las muestras se lavaron con agua destilada.

15. Se realizó contra tinción utilizando de hematoxilina/eosina (azul) (8 minutos) lo que permitió visualizar los núcleos celulares.

16. Por último, las células se lavaron con agua destilada, solución de lavado y de nuevo agua destilada y se prepararon para su visualización y lectura.

2.2.2 Lectura de la expresión.

La lectura de la expresión y marcaje del antígeno CD133 se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de las Nieves. Dos evaluadores determinaron de forma independiente la intensidad de la tinción en campos escogidos al azar y tras la magnificación de las secciones teñidas (Figura 7).

Dicha tinción se evaluó como negativo (-), tinción débil (+), tinción intermedia (++) y tinción fuerte (+++), correlacionado con el mismo grado de expresión del antígeno. El número total de células en cada campo y el número de células teñidas fue calculado (porcentaje de inmuno reactividad).

La lectura del marcaje de MGMT se hizo de forma automática con el sistema DAKO ACIS III para cuantificación inmunohistoquímica. La evaluación de la tinción se hizo de forma similar a lo anteriormente expuesto. No obstante, para una simplificación en el proceso de correlación se establecieron dos categorías denominadas baja y alta expresión.

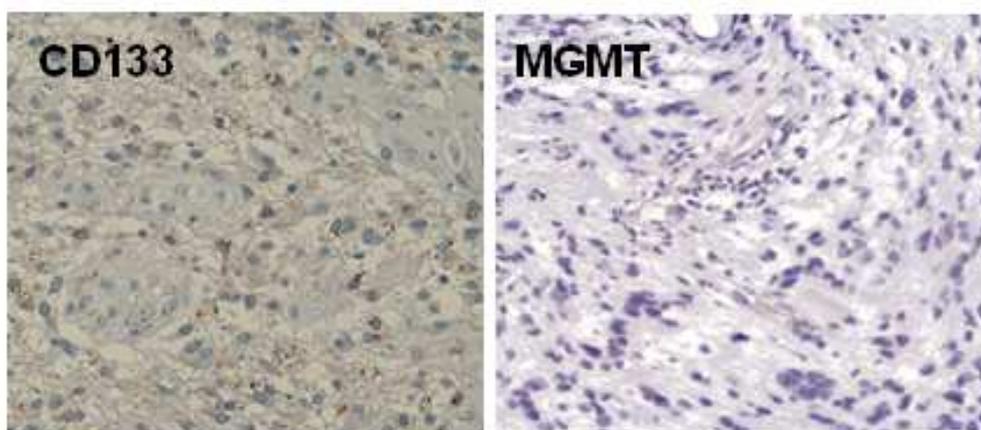


Figura 7: Los anticuerpos para CD133 y MGMT se utilizaron en técnicas inmuno histoquímicas para determinar la expresión de dichas moléculas en cortes de glioblastomas multiforme.

2.3 Pacientes: Registro de datos.

Los datos obtenidos de cada uno de los pacientes fueron registrados en una base de datos creada para ello (SPSS), partiendo de los datos obtenidos de las historias clínicas, en la que se incluyeron:

2.3.1 Datos de filiación del paciente.

2.3.2 Datos clínicos:

- Sexo: 0: hombre, 1: mujer
- Edad
- Tiempo transcurrido desde el comienzo de la clínica hasta el diagnóstico del tumor: 0: < 3 mes, 1: > 3 meses
- Fecha del diagnóstico

2.3.3 Datos del tumor:

- Histología: 0: GBM, 1: AA, 2: OA, 3: mixtos
- Localización (Lóbulo): 0: frontal, 1: parietal, 2: temporal, 3: occipital, 4: más de 1 lóbulo
- Metilación de MGMT: 0: No, 1: Si
- Proteína MGMT: 0: más/menos, 1: +, 2: ++, 3: +++
- Expresión CD133: 0: más/menos, 1: +, 2: ++, 3: +++
- Porcentaje de inmuno reactividad de CD133: 0: -, 1: +, 2: ++, 3: +++
- Ki 67: numérico
- p53: numérico

2.3.4 Datos del tratamiento:

- Tipo de cirugía: 0: biopsia o resección menor del 25%, 1: resección parcial, 2: resección completa
- Anticomiciales: 0: Si, 1: No
- Implante de Carmustina: 0: No, 1: Si
- Radioterapia-Temozolamida concurrente: 0: No, 1: Si
- Temozolamida adyuvante: 0: No, 1: Si
- Número de ciclos de Temozolamida adyuvante
- Radiocirugía: 0: No, 1: Si
- Reintervención: 0: No, 1: Si

- Quimioterapia de 2º/3º línea: 0: No, 1: Temozolamida estándar, 2: Temozolamida diaria, 3: Otros

La cirugía podía consistir en biopsia, resección parcial o una resección macroscópicamente completa (entendiéndose como la resección de todo el tumor visible). El tratamiento complementario consistió en radioterapia externa mediante tres campos conformados sobre área de riesgo subclínico hasta una dosis total de 60 Gy a fracciones de 2 Gy al día concomitante con temozolamida 75mg/m² de superficie corporal diario desde el primer al último día de la radioterapia. En los pacientes que su estado general y comorbilidades lo permitieron fueron tratados con Temozolamida 75 mg/m² diario concomitante con la radioterapia y temozolamida 150-200 mg/m² días 1-5/28 días adyuvante durante 12 ciclos si la RM de control mostraba una respuesta completa, sino el tratamiento se mantenía hasta conseguir una respuesta completa o progresión de la enfermedad.

2.3.5 Datos de toxicidad al tratamiento:

- Náuseas/vómitos: 0: Grado 1-2, 1: Grado 3, 2: Grado 4
- Astenia: 0: Grado 1-2, 1: Grado 3, 2: Grado 4
- Trombopenia: 0: Grado 1-2, 1: Grado 3, 2: Grado 4
- Neutropenia afebril: 0: Grado 1-2, 1: Grado 3, 2: Grado 4
- Neutropenia febril: 0: No, 1: Si
- Reducción de dosis: 0: No, 1: Si

2.3.6 Datos de respuesta:

- Respuesta clínica: 0: Progresión tumoral, 1: Estabilización de la enfermedad, 2: Respuesta parcial, 3: Respuesta completa
- Respuesta radiológica: 0: Progresión tumoral, 1: Estabilización de la enfermedad, 2: Respuesta parcial, 3: Respuesta completa
- Respuesta por SPECT: 0: Progresión tumoral, 1: Estabilización de la enfermedad, 2: Respuesta parcial, 3: Respuesta completa

La determinación de la respuesta radiológica se hizo siguiendo los criterios de Macdonald (Tabla 1), que evalúan cuatro características: comportamiento morfológico del tumor en T1 y T2, comportamiento del edema, necesidad de esteroides y exploración clínica neurológica (Macdonald y cols. 1990).

Tabla 1: Criterios de respuesta de Macdonald.

	Realce T1/T2	Edema	Necesidad esteroides	Exploración neurológica
Respuesta completa (RC)	Ausente	Ausente	No precisa	Estable o mejor
Respuesta parcial (RP)	Descenso del 50% del tamaño	Descenso	Estables o en descenso	Estable o mejor
Progresión tumoral (PT)	Aumento del 25% del tamaño o nuevas lesiones	Incremento	Incremento	Peor
Enfermedad estable (EE)	El resto	El resto	El resto	El resto

2.3.7 Datos del seguimiento:

- Tiempo hasta la progresión (meses)
- Situación actual: 0: éxitus, 1: vivo con enfermedad, 2: vivo sin enfermedad
- Fecha de último contacto

2.4 Estudio estadístico.

Una vez obtenida la metilación del promotor de MGMT y la expresión inmunohistoquímica de proteína MGMT, CD133, Ki67, p53 en las muestras tumorales, se procedió a realizar un estudio estadístico con el objetivo de correlacionarlas con la tasa de respuestas y la supervivencia. A partir del software estadístico SPSS 15.0 para Windows se realizó el siguiente análisis:

En un primer momento se hizo un análisis descriptivo de las variables recogidas de los pacientes a estudio. Para las variables cuantitativas se calcularon medidas de tendencia central y dispersión. Para las cualitativas, frecuencias absolutas y relativas.

Se hicieron tablas de contingencia para ver la relación entre metilación de MGMT y expresión proteica de MGMT, y entre expresión de CD133 y porcentaje de inmuno reactividad nuclear de CD133. El estadístico utilizado para contrastar las diferencias fue el Chi- cuadrado de Pearson con corrección

por continuidad y el test exacto de Fisher en los casos en los que el porcentaje de frecuencias esperadas inferior a 5 fue mayor del 20%.

Posteriormente se realizó un análisis bivalente para estudiar qué variables se relacionaban con la respuesta clínica y con la respuesta radiológica. Para contrastar la hipótesis de normalidad se utilizó el test de Shapiro-Wilks. Para analizar la relación entre las variables cuantitativas se empleó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para las cualitativas se utilizó chi-cuadrado de Pearson y Fisher cuando fue necesario.

Se realizó un análisis de supervivencia con el método de Kaplan Meier, considerando el tiempo desde el diagnóstico hasta la de último seguimiento o muerte. Se comparó la supervivencia global entre los distintos grupos por el método de Log-Rank. Se calcularon medias y medianas de supervivencia global y las diferentes probabilidades así como su intervalo de confianza al 95%. Se analizó también la supervivencia libre de progresión considerando el tiempo desde el diagnóstico hasta la progresión. Se comparó la supervivencia libre de progresión entre los distintos grupos por el método de Log-Rank. Se calcularon medias y medianas de supervivencia libre de progresión y las diferentes probabilidades así como su intervalo de confianza al 95%.

También se crearon distintos subgrupos pronósticos en base a la combinación de diversas variables de interés (metilación de MGMT, proteína MGMT, expresión de CD133) para los que se compararon las posibles diferencias en la supervivencia global y libre de progresión mediante el test de Log-Rank.

Para todos los análisis se consideró significativo un valor $p < 0.05$.

Resultados

1. DETERMINACIÓN DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DE MGMT.

1.1 Optimización de la técnica de extracción de ADN de muestras tumorales incluidas en parafina.

La optimización de la extracción de ADN de las muestras incluidas en parafina para procesamiento mediante bisulfito se realizó a partir de diferentes protocolos, que incluyeron los de Chan y cols., 2001; Jiménez y cols., 2007 y Coura y cols., 2005, y las propias observaciones realizadas en nuestro laboratorio. Este proceso nos condujo a la obtención de un procedimiento que permitiera el máximo rendimiento en cuanto a la pureza y concentración de DNA y a los mejores resultados en su posterior utilización en los estudios de metilación mediante PCR. Exponemos de forma resumida el proceso y los principales hallazgos en el desarrollo del mencionado protocolo.

- **Protocolo 1.** Se utilizó directamente xileno sobre muestras en las que previamente se había eliminado la parafina circundante. A continuación, se llevó a cabo una incubación de 30 minutos a 60°C, procediéndose posteriormente a eliminar el xileno mediante lavados con concentraciones decrecientes de etanol. Finalmente se procedió a la digestión mediante proteinasa K, realizando dos incubaciones, la primera 56 °C durante una hora y la segunda a 90 °C durante 30 minutos para revertir las uniones ADN-parafina y se aplicó un proceso de extracción de ADN (Qiagen).

Se procedió a la determinación mediante espectrofotometría de la concentración y calidad de la muestra obteniéndose una ratio 260/280 aceptable pero una concentración excesivamente baja (Figura 1).

Además, para determinar si estas muestras eran susceptibles de ser sometidas a PCR para la amplificación de secuencias génicas, se procedió a un chequeo mediante gel de agarosa (1,8%) y posterior PCR con los primers control para GADPH y beta actina, cadena pesada de la miosina (MHC) y diferentes cantidades de muestra de ADN (entre 2µl y 4µl).

Como podemos ver en la Figura 1 las muestras de ADN obtenidas se caracterizan por presentar un “smear” que indica degradación del ácido nucleico. La PCR consiguió amplificar de forma muy débil GADPH y beta

A

	Prueba 1
Absorbancia 260	0,033
Absorbancia 280	0,016
Absorbancia 320	0
[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	0,085
Ratio 260/280	2

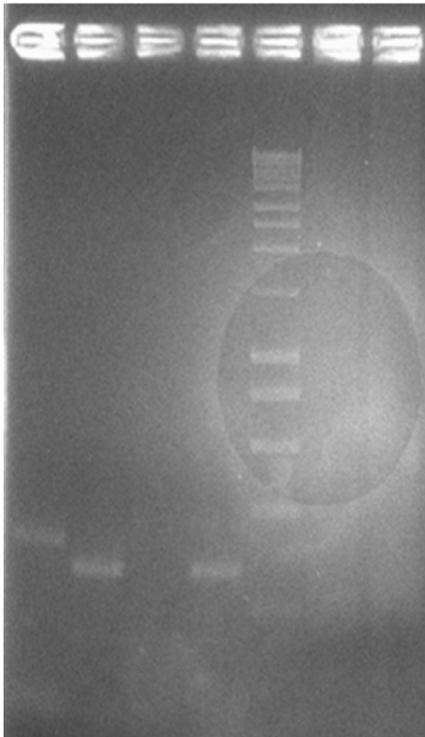
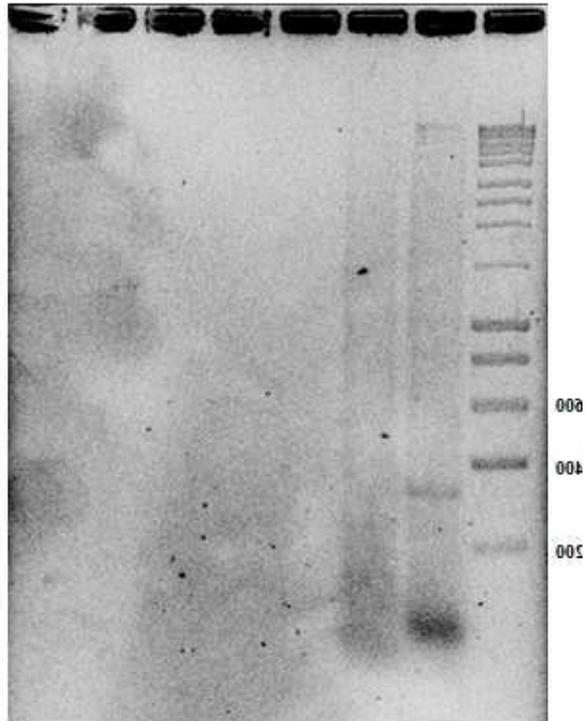
B**1 2 3 4 5 6 7****C****1 2 3**

Figura 1. Obtención de DNA de muestra de glioblastoma en parafina para el estudio de metilación (**Protocolo 1**). A. Ejemplo representativo de la calidad de DNA obtenido. B. Amplificación mediante PCR de GADPH (2 μl muestra) (1) y β - actina (2 μl muestra) (2); GADPH (4 μl muestra) (3); β actina (4 μl muestra) (4); Se muestra el PM (5) y un chequeo de DNA (10 μl) (6) y 7. DNA (20 μl) (7). C. Amplificación mediante PCR de MHC (1); β -actina (2); Se muestra el PM (3).

actina mientras que no se obtuvo ningún resultado en la amplificación del gen MHC. Estos resultados nos permiten concluir que la utilización del Protocolo 1 ofrece un bajo rendimiento debido a las bajas concentraciones de DNA obtenidas.

- **Protocolo 2.** Las muestras fueron mantenidas en xileno a 90°C durante 10 minutos, posteriormente a 65 °C un minuto y finalmente se centrifugaron a 13.000 r.p.m. para retirar la parafina, siguiendo un protocolo modificado de Coombs y cols. (1999). Se realizó un tratamiento con proteinasa K similar al descrito previamente y la extracción de ADN se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que en el protocolo 1 (Qiagen).

El análisis espectrofotométrico demostró un incremento sensible de la concentración de DNA y una mejora de la calidad del mismo (Figura 2). Como en el caso anterior, se realizó PCR con los primers para los genes GADPH, beta-actina, MHCI (Figura 2). El resultado de este estudio mostró una falta de amplificación de los genes testados y la aparición de bandas inespecíficas. Por tanto, a pesar de la mejora en la obtención de los ácidos nucleicos, el protocolo 2 no permite una amplificación génica para el posterior estudio de metilación.

-**Protocolo 3.** Las muestras fueron mantenidas en xileno con eliminación de la parafina circundante al tejido. Posteriormente las muestras se incubaron durante 15 minutos a 37° C con agitación cada 5 minutos durante 15 segundos. La eliminación de xileno se realizó mediante tres lavados con etanol al 100%, al 90% y al 70% respectivamente. Finalmente, una vez eliminado el xileno se realizó una doble digestión con proteinasa K durante 45 minutos a 56° C y 5 minutos 28°C, se agitó durante un minuto aproximadamente y se realizó una segunda incubación a 90 ° C durante 55 minutos y 28 ° C durante 5 minutos. Finalmente la extracción de ADN se llevó a cabo mediante protocolo establecido (Qiagen). El análisis espectrofotométrico demostró una buena calidad del ADN (Figura 3). El estudio mediante PCR incluyó a los genes de beta-actina, GADPH, NFM y MAP-2.

A

	Prueba 2
Absorbancia 260	0,022
Absorbancia 280	0,010
Absorbancia 320	0,001
[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	0,11
Ratio 260/280	2,091

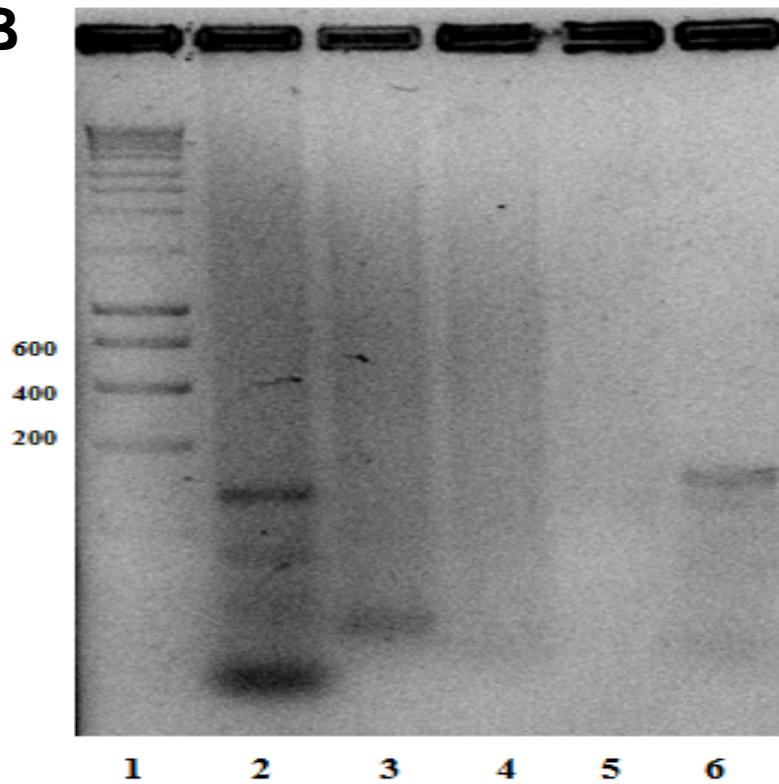
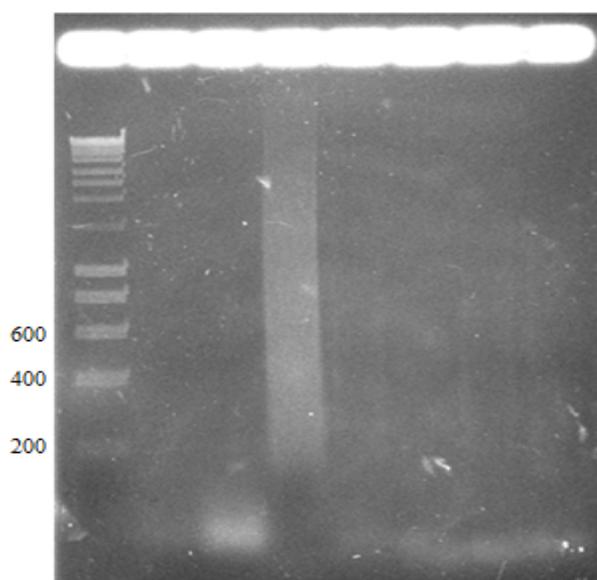
B

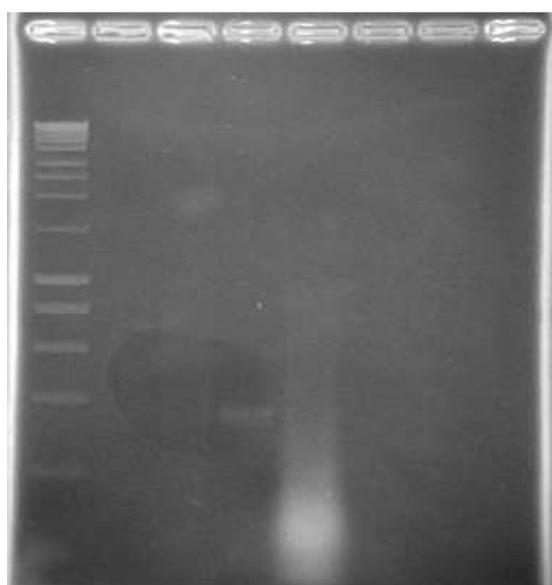
Figura 2. Obtención de DNA de muestra de glioblastoma en parafina para el estudio de metilación (**Protocolo 2**). A. Ejemplo representativo de la calidad de DNA obtenido. B. Amplificación mediante PCR de GADPH (2); β - actina (3); MHC1 (4 y 6). Se muestra el PM (1) y un chequeo de DNA (5).

A

	Paciente 1	Paciente 2
Absorbancia 260	0,052	0,036
Absorbancia 280	0,101	0,095
Absorbancia 320	0,151	0,151
[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	0,25	0,29
Ratio 260/280	1,980	1,983

B

1 2 3 4 5 6 7 8

C

1 2 3 4 5 6

Figura 3. Obtención de DNA de muestra de glioblastoma en parafina para el estudio de metilación (**Protocolo 3**). A. Ejemplo representativo de la calidad de DNA obtenido. Se muestra los resultados obtenidos en el paciente1 y 2. B. Amplificación mediante PCR de β - actina (3); GADPH (5); β - actina (5); GADPH (6); MAP-2 (7) y NFM (8). Se muestra el PM (1) y un chequeo de DNA ($6\mu\text{l}$)(4). C. Amplificación mediante PCR de Beta-Tubulina III (paciente 1) (2); Beta Tubulina III (paciente 2) (3); Control positivo Beta Tubulina III (4). Se muestra también el PM (1); Beta Tubulina III en DNA contaminado de RNA (5) y control negativo (6).

Como se observa en la Figura 3, no se detectó ninguna amplificación, y si un smear que indicaba una alta degradación del DNA. Además, se realizó una segunda PCR con primer de beta- tubulina III incluyendo un tratamiento con DMSO para proteger el DNA durante el proceso. No obstante, como se puede observar en la Figura 3, sólo se amplificó una débil banda en el control positivo no existiendo amplificación en las muestras problema (Figura 4).

Nuevas pruebas de PCR utilizando el protocolo 3 con GADPH como control y primers para la amplificación de MGMT no metilado (93 bp) (Zheng y cols., 2009) demostraron amplificación de bandas pero con un amplio smear en las muestras testadas.

-Protocolo 4. Las muestras fueron procesadas de forma similar al Protocolo 3 incluyendo dos modificaciones importantes: 1) el pretratamiento incluyó una fragmentación mediante la punta de la pipeta para que la superficie de acción en la que actúa el xileno fuese mayor y que los posteriores lavados fueran más eficientes, evitando la formación de conglomerado de parafina y 2) el xileno se mantuvo en contacto con la muestra durante toda la noche. Posteriormente las muestras se procesaron siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente. Los resultados obtenidos tanto en las pruebas de espectrofotometría como en PCR demostraron una amplificación del promotor del gen MGMT no metilado en todas las muestras (Figura 5). Estos resultados nos permitieron concluir que este protocolo era el más adecuado para el objetivo de obtener DNA y posteriormente analizar metilación en muestras de DNA de glioblastoma.

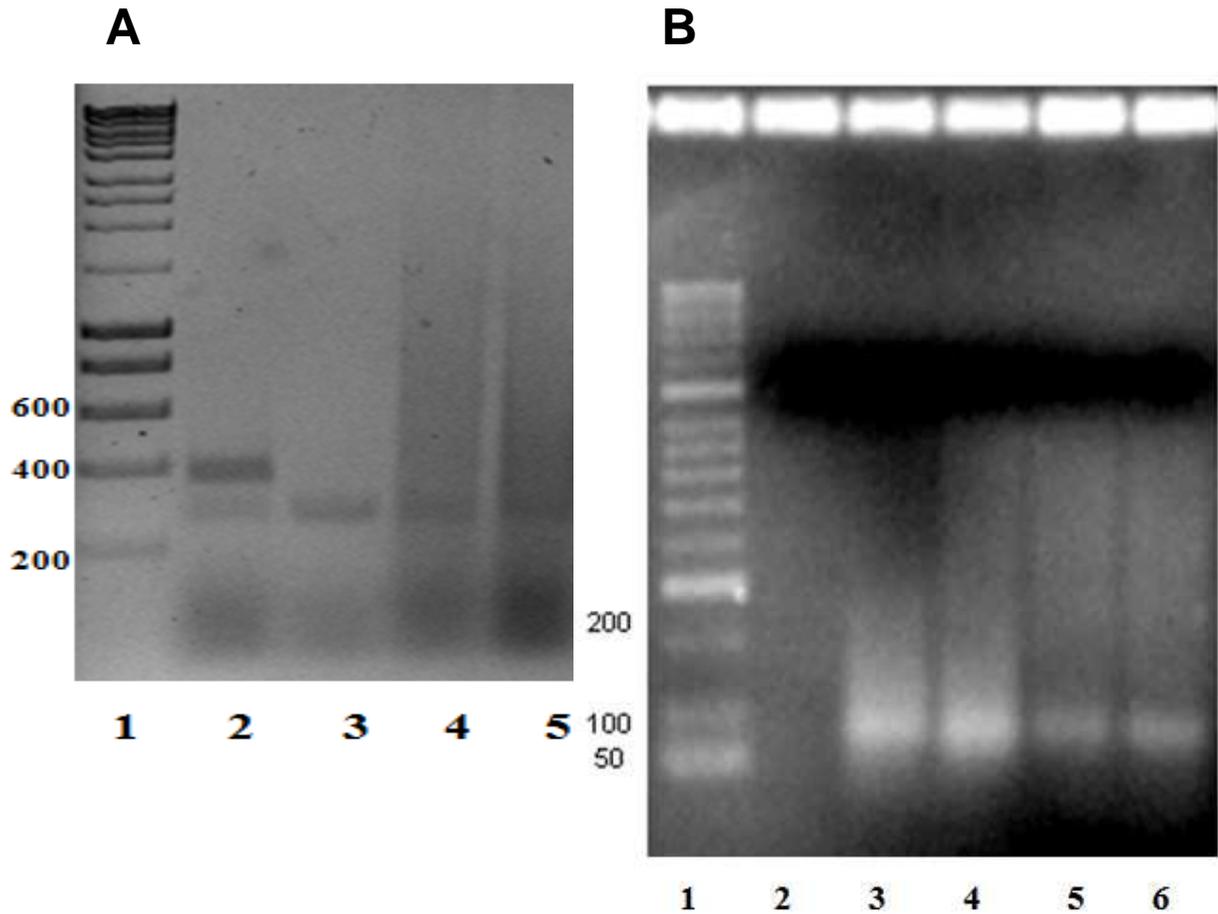


Figura 4. Obtención de DNA de muestra de glioblastoma en parafina para el estudio de metilación (**Protocolo 3bis**). A. Amplificación mediante PCR de GADPH (control positivo) (2); GADPH (paciente 1) (3) y GADPH (paciente 2). Se muestra también PM (1) y el control negativo (2). B. PCR de MGMT de líneas de glioblastoma SF (2) y SK (3); MGMT de Paciente 1 (5); MGMT de paciente 2 (6). Las líneas celulares neuronales SH y SF se utilizaron como control positivo

A

Paciente	Abs. 260	Abs. 280	Abs. 320	Ratio	Conc. Real
3	0,249	0,127	0,001	1,9286	0,6
4	0,126	0,063	0,001	1,984	0,32
5	0,03	0,013	0	2,308	0,075
6	0,01	0,003	0,002	2,4	0,03
7	0,075	0,038	0,002	2,028	0,185
8	0,115	0,059	0	1,949	0,29

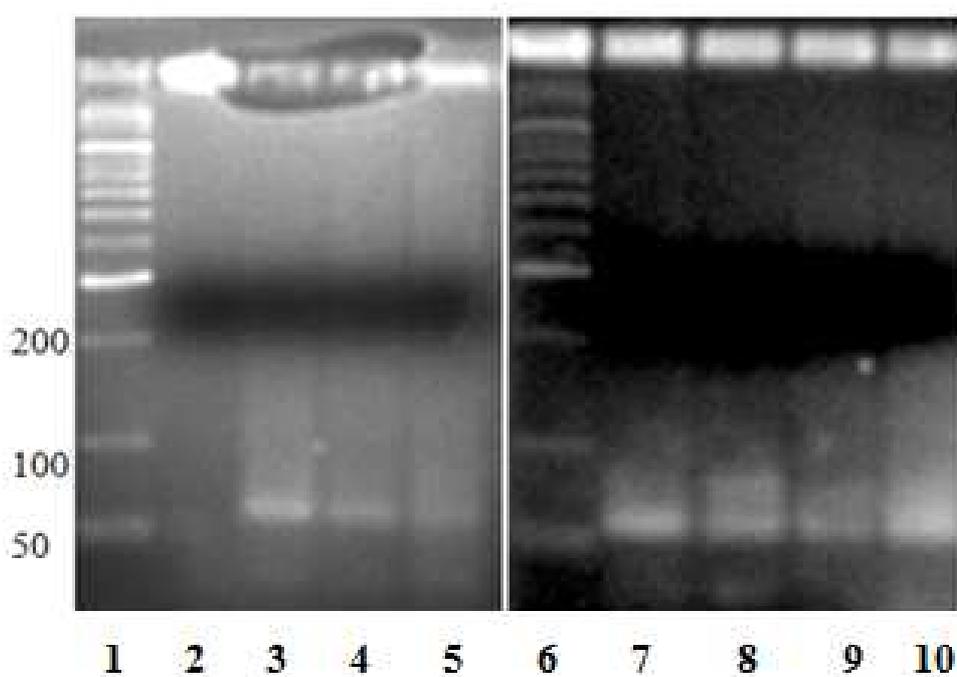
B

Figura 5. Obtención de DNA de muestra de glioblastoma en parafina para el estudio de metilación (**Protocolo 4**). A. Ejemplo representativo de la calidad de DNA obtenido. Se muestra los resultados obtenidos en el paciente 1 al 8. B. Amplificación mediante PCR de MGMT de la línea SH (4); pacientes 3 a 8 (5-10). Se muestra el PM (1), el control negativo (2). La línea SH se utilizó como control positivo.

1.2 Análisis de metilación del promotor de MGMT.

El análisis de los resultados obtenidos mediante las PCR del promotor de MGMT metilado en los pacientes analizados (Tabla 5) nos permite afirmar que en nuestro grupo de estudio el 43,6% de los pacientes presentan metilación de dicho promotor mientras que un 53,8% no lo presentan. En un pequeño porcentaje (2,6%) no se pudo realizar el estudio. En las muestras de los pacientes 42 y 43 por no poder extraerse ADN del material fijado en parafina.

Las Figuras 6 y 7 muestran el resultado de las PCR del promotor de MGMT en los pacientes analizados.

PACIENTE	Estado de Metilación del promotor de MGMT		PACIENTE	Estado de Metilación del promotor de de MGMT
Paciente 1	Positiva		Paciente 23	Negativa
Paciente 2	Positiva		Paciente 24	Negativa
Paciente 3	Positiva		Paciente 25	Negativa
Paciente 4	Positiva		Paciente 26	Positiva
Paciente 5	Positiva		Paciente 27	Positiva
Paciente 6	Negativa		Paciente 28	Positiva
Paciente 7	Positiva		Paciente 29	Positiva
Paciente 8	Positiva		Paciente 30	Negativa
Paciente 9	Positiva		Paciente 31	Positiva
Paciente 10	Positiva		Paciente 32	Positiva
Paciente 11	Positiva		Paciente 33	Positiva
Paciente 12	Negativa		Paciente 34	Negativa
Paciente 13	Negativa		Paciente 35	Positiva
Paciente 14	Negativa		Paciente 36	Positiva
Paciente 15	Positiva		Paciente 37	Negativa
Paciente 16	Positiva		Paciente 38	Positiva
Paciente 17	Negativa		Paciente 39	Negativa

Paciente 18	Negativa		Paciente 40	Negativa
Paciente 19	Positiva		Paciente 41	Negativa
Paciente 20	Positiva		Paciente 42	Perdido
Paciente 21	Negativa		Paciente 43	Perdido
Paciente 22	Negativa		Paciente 44	Negativa
Paciente 45	Negativa		Paciente 46	Negativa
Paciente 47	Negativa		Paciente 48	Positiva
Paciente 49	Positiva		Paciente 50	Negativa
Paciente 51	Negativa		Paciente 52	Negativa
Paciente 53	Negativa		Paciente 54	Negativa
Paciente 55	Negativa		Paciente 56	Negativa
Paciente 57	Negativa		Paciente 58	Negativa
Paciente 59	Negativa		Paciente 60	Positiva
Paciente 61	Negativa		Paciente 62	Positiva
Paciente 63	Positiva		Paciente 64	Negativa
Paciente 65	Negativa		Paciente 66	Negativa
Paciente 67	Negativa		Paciente 68	Negativo
Paciente 69	Negativa		Paciente 70	Positiva
Paciente 71	Positiva		Paciente 72	Negativa
Paciente 73	Negativa		Paciente 74	Negativo
Paciente 75	Positiva		Paciente 76	Negativa
Paciente 77	Positiva		Paciente 78	Positiva

Tabla 5. Representación de los resultados del estado de metilación del promotor de MGMT en el grupo de pacientes objeto del estudio.

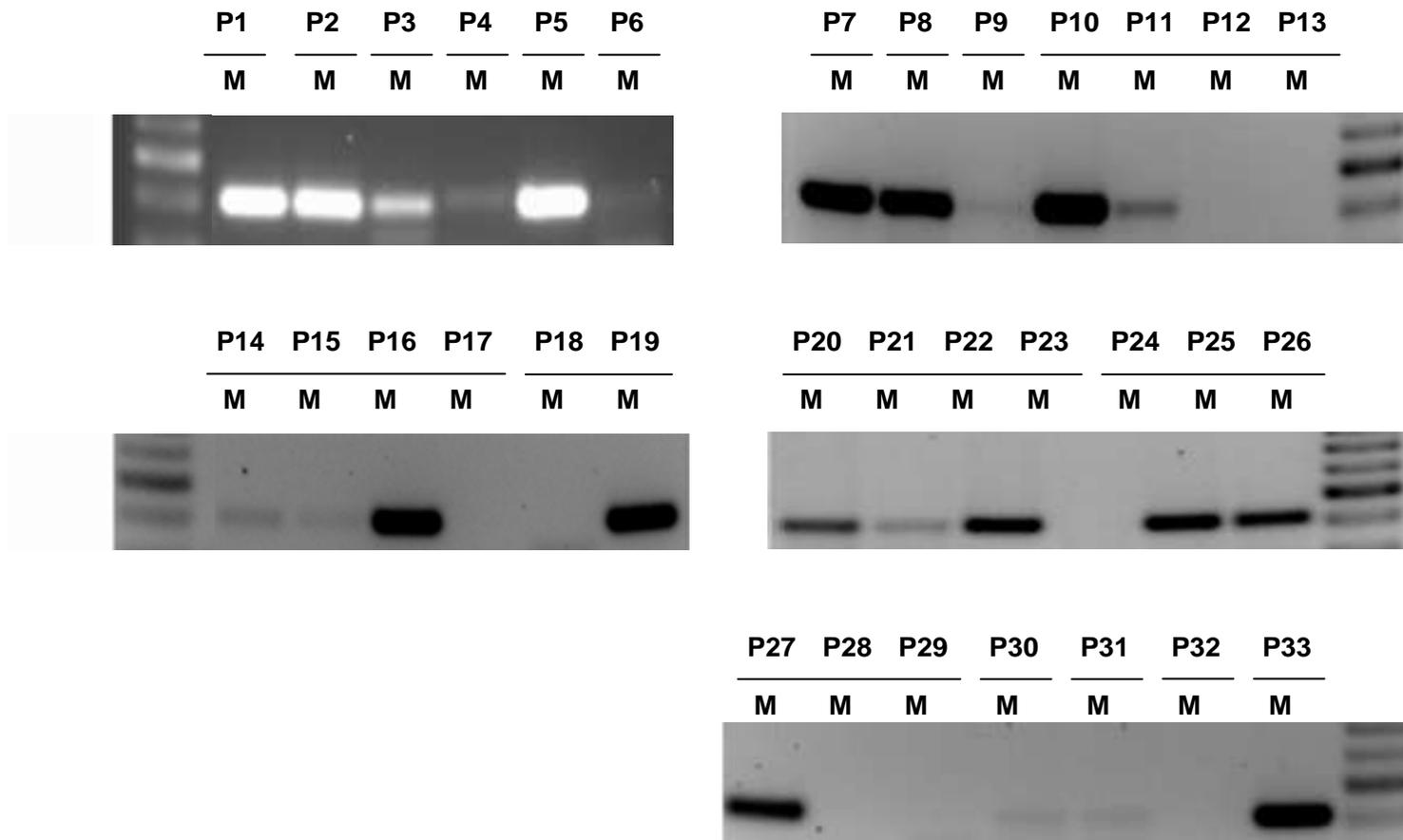


Figura 6. Resultados del estudio de metilación (MSP) de promotor de MGMT en pacientes con GBM (Grupo de Granada). Las bandas representan el promotor de la enzima MGMT metilado. La P indica el paciente sobre el que se ha realizado el análisis.

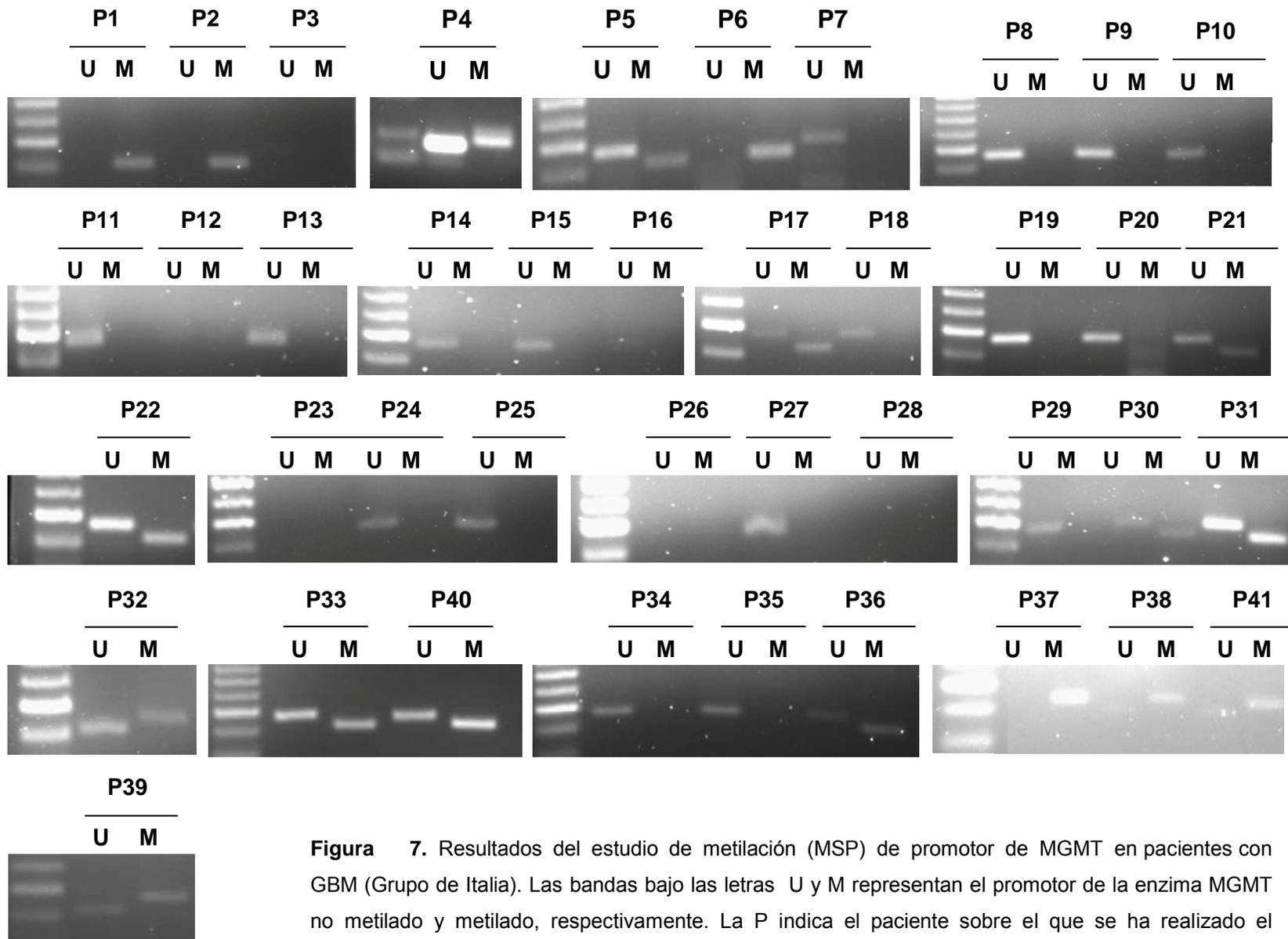


Figura 7. Resultados del estudio de metilación (MSP) de promotor de MGMT en pacientes con GBM (Grupo de Italia). Las bandas bajo las letras U y M representan el promotor de la enzima MGMT no metilado y metilado, respectivamente. La P indica el paciente sobre el que se ha realizado el análisis.

2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO

El grupo de pacientes de nuestro estudio fue sometido a un análisis de expresión de MGMT y CD133 (Figuras 8 y 9) mediante inmunohistoquímica y siguiendo los protocolos previamente descritos (ver Material y Métodos).

De las 76 biopsias que pudimos analizar para la expresión de MGMT, 42 (55,3%) presentaron una intensidad de expresión ausente o débil (+/- o +) mientras que 34 (44,7%) presentaron una intensidad fuerte o muy fuerte (++ o +++) (Tabla 6). El objeto de hacer dos grupos en base a la intensidad de expresión fue su posterior utilización en los análisis de correlación con otras variables.

PACIENTE	Expresión de proteína MGMT		PACIENTE	Expresión de proteína MGMT
Paciente 1	+		Paciente 23	+
Paciente 2	+		Paciente 24	+/-
Paciente 3	+		Paciente 25	+++
Paciente 4	++		Paciente 26	+++
Paciente 5	+		Paciente 27	++
Paciente 6	+		Paciente 28	+
Paciente 7	+++		Paciente 29	+
Paciente 8	+/-		Paciente 30	+
Paciente 9	+		Paciente 31	+++
Paciente 10	+++		Paciente 32	+
Paciente 11	++		Paciente 33	+++
Paciente 12	+++		Paciente 34	++
Paciente 13	+		Paciente 35	+/-
Paciente 14	+/-		Paciente 36	+
Paciente 15	+++		Paciente 37	++
Paciente 16	+		Paciente 38	+++

Paciente 17	++	Paciente 39	+++
Paciente 18	+++	Paciente 40	+
Paciente 19	++	Paciente 41	+/-
Paciente 20	+/-	Paciente 42	Perdido
Paciente 21	++	Paciente 43	Perdido
Paciente 22	++	Paciente 44	+
Paciente 45	+/-	Paciente 46	+
Paciente 47	+	Paciente 48	++
Paciente 49	+	Paciente 50	+
Paciente 51	+	Paciente 52	+
Paciente 53	+	Paciente 54	+/-
Paciente 55	+/-	Paciente 56	++
Paciente 57	++	Paciente 58	+
Paciente 59	+++	Paciente 60	+
Paciente 61	+	Paciente 62	+/-
Paciente 63	+/-	Paciente 64	+
Paciente 65	++	Paciente 66	+++
Paciente 67	++	Paciente 68	++
Paciente 69	++	Paciente 70	++
Paciente 71	++	Paciente 72	+++
Paciente 73	+	Paciente 74	++
Paciente 75	+	Paciente 76	+++
Paciente 77	+	Paciente 78	+

Tabla 6. Representación de los resultados del estado de expresión de proteína MGMT en el grupo de pacientes objeto del estudio.

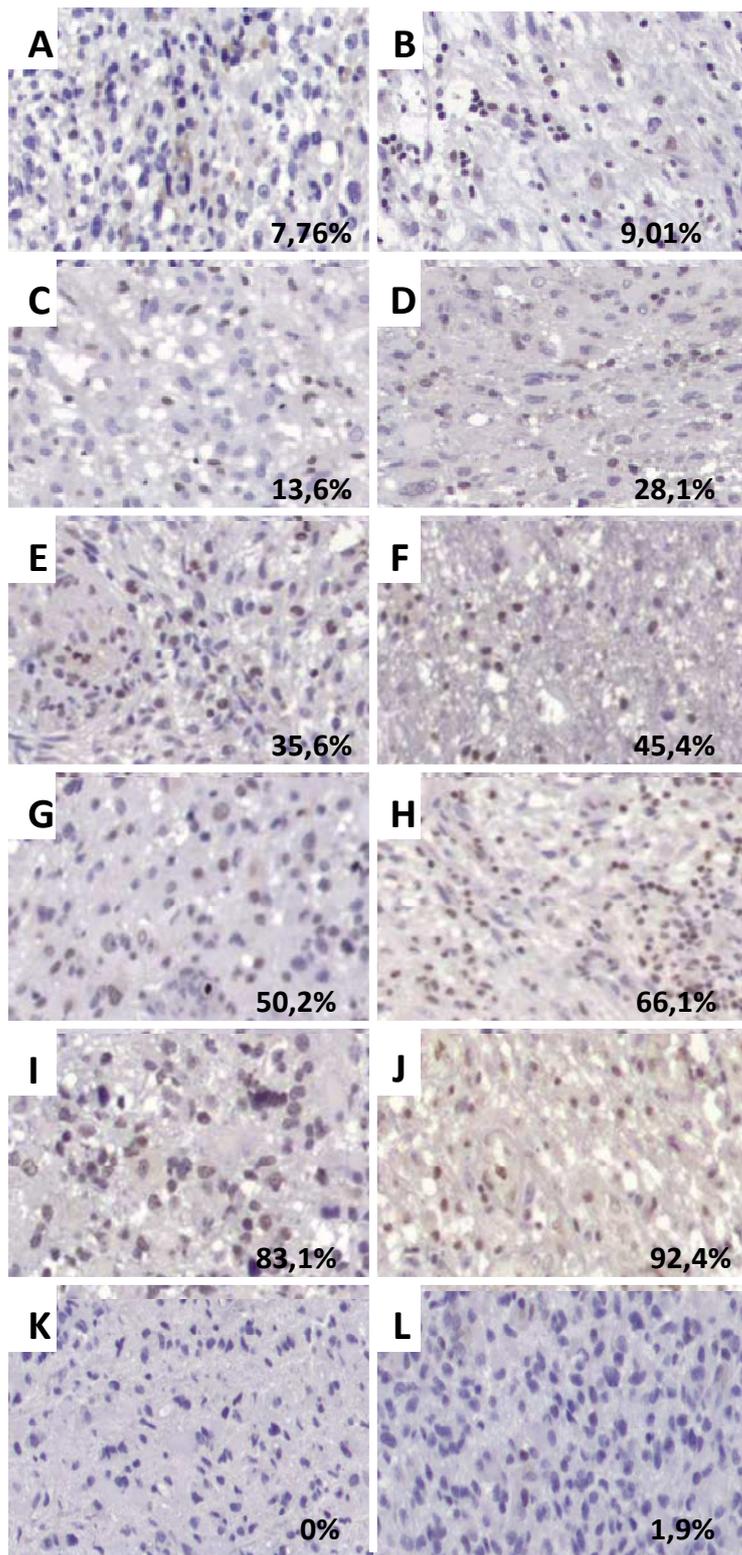


Figura 8. Imagen representativa del marcaje de MGMT en pacientes con Glioblastoma multiforme. Los marcajes muestran diferente porcentaje de expresión positiva (A-J) y expresión negativa (K-L).

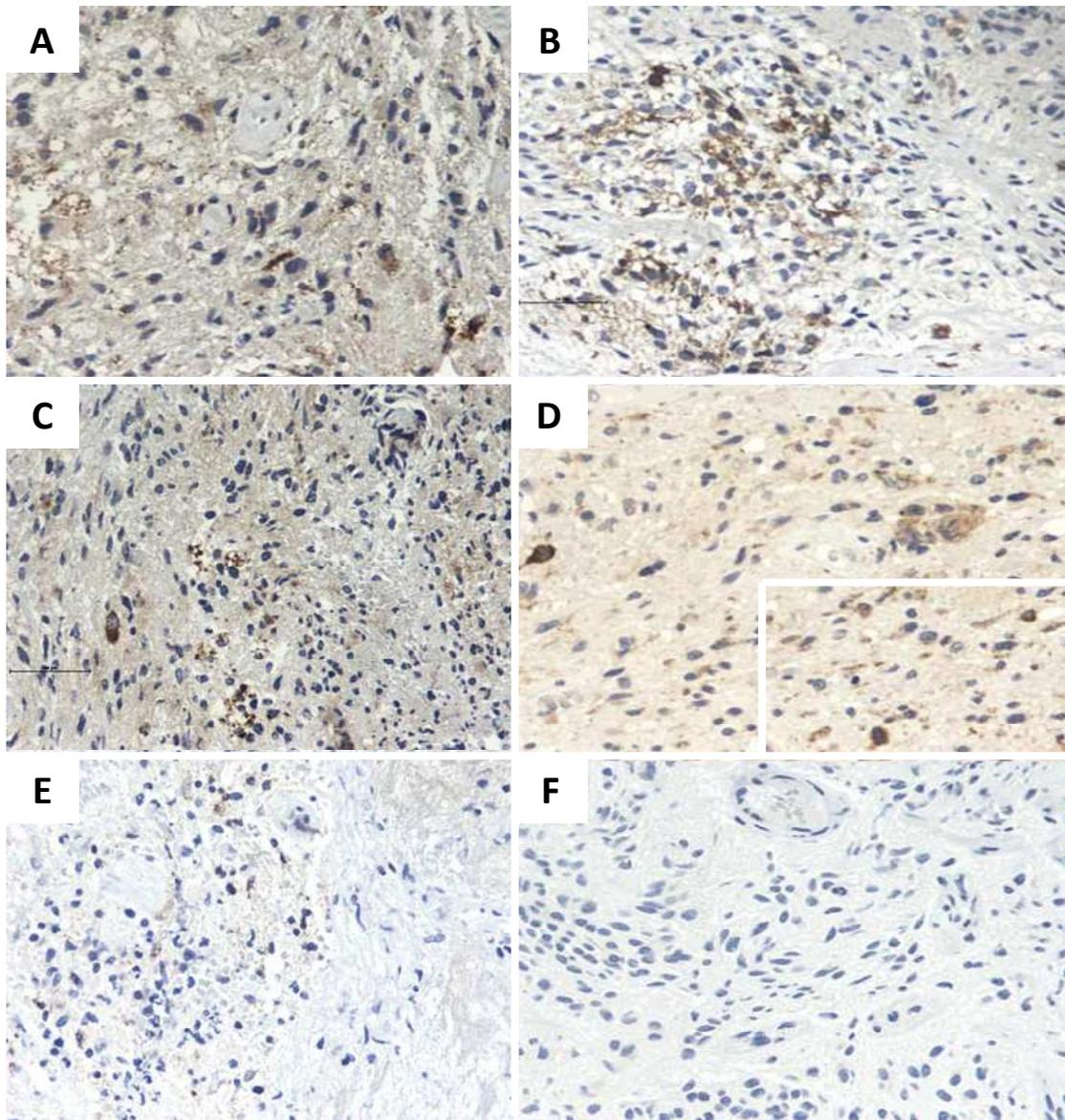


Figura 9. Imagen representativa del marcaje de CD133 en pacientes con Glioblastoma multiforme. Los marcajes muestran un porcentaje de expresión del 5-25% (A-B), del 25-75% (C), de más del 75% (D) (se muestra detalle del marcaje) y de menos del 5% (E-F).

Por otra parte, cuando las muestras (75) fueron analizadas para determinar la expresión de CD133, 41 (54,7%) presentaron una intensidad de expresión débil y las 34 biopsias restantes (45,3%) presentaron una intensidad de expresión de la proteína fuerte/muy fuerte (Tabla 7).

PACIENTE	Expresión de CD133		PACIENTE	Expresión de CD133
Paciente 1	++		Paciente 23	++
Paciente 2	+		Paciente 24	+
Paciente 3	++		Paciente 25	++
Paciente 4	+		Paciente 26	++
Paciente 5	+++		Paciente 27	++
Paciente 6	+		Paciente 28	+
Paciente 7	+		Paciente 29	+
Paciente 8	++		Paciente 30	++
Paciente 9	+		Paciente 31	+
Paciente 10	++		Paciente 32	++
Paciente 11	+		Paciente 33	+++
Paciente 12	+		Paciente 34	+
Paciente 13	+		Paciente 35	+
Paciente 14	+		Paciente 36	++
Paciente 15	++		Paciente 37	++
Paciente 16	+		Paciente 38	+
Paciente 17	+		Paciente 39	Perdido
Paciente 18	+		Paciente 40	+
Paciente 19	++		Paciente 41	+
Paciente 20	+		Paciente 42	Perdido
Paciente 21	+		Paciente 43	Perdido
Paciente 22	++		Paciente 44	+
Paciente 45	+		Paciente 46	+
Paciente 47	+		Paciente 48	++
Paciente 49	++		Paciente 50	+++

Paciente 51	+++		Paciente 52	+
Paciente 53	++		Paciente 54	+
Paciente 55	++		Paciente 56	++
Paciente 57	+		Paciente 58	+++
Paciente 59	+		Paciente 60	++
Paciente 61	+		Paciente 62	+
Paciente 63	+		Paciente 64	+
Paciente 65	++		Paciente 66	+++
Paciente 67	++		Paciente 68	++
Paciente 69	++		Paciente 70	+
Paciente 71	+++		Paciente 72	+
Paciente 73	+		Paciente 74	+
Paciente 75	+		Paciente 76	+
Paciente 77	++		Paciente 78	++

Tabla 7. Representación de los resultados del estado de expresión de CD133 en el grupo de pacientes objeto del estudio.

Por último, se realizó un estudio de expresión de marcadores habitualmente utilizados en clínica como son p53, ki67, vimentina, EGFR y S-100. Los resultados de Ki-67 y p53 se muestran en la Tabla 8. Este estudio sólo pudo ser realizado en las muestras obtenidas en el Hospital universitario Virgen de las Nieves.

PACIENTE	Ki-67 (%)	P53 (%)	PACIENTE	Ki-67 (%)	P53 (%)
Paciente 1	Perdido	Perdido	Paciente 23	35	20
Paciente 2	10	0	Paciente 24	Perdido	Perdido
Paciente 3	Perdido	Perdido	Paciente 25	20	70
Paciente 4	20	10	Paciente 26	Perdido	Perdido
Paciente 5	20	10	Paciente 27	25	5
Paciente 6	20	0	Paciente 28	10	0
Paciente 7	10	5	Paciente 29	40	60
Paciente 8	50	40	Paciente 30	20	0
Paciente 9	10	5	Paciente 31	30	25
Paciente 10	25	60	Paciente 32	60	70
Paciente 11	Perdido	Perdido	Paciente 33	20	0
Paciente 12	10	0	Paciente 34	5	10
Paciente 13	10	20	Paciente 35	10	0
Paciente 14	20	2	Paciente 36	20	0
Paciente 15	35	25	Paciente 37	20	5
Paciente 16	22	30	Paciente 38	40	30
Paciente 17	Perdido	Perdido	Paciente 39	15	30
Paciente 18	20	5	Paciente 40	20	0
Paciente 19	Perdido	Perdido	Paciente 41	20	5
Paciente 20	30	15	Paciente 42	Perdido	Perdido
Paciente 21	20	0	Paciente 43	Perdido	Perdido
Paciente 22	25	5			

Tabla 7. Representación de los resultados del estado de expresión de Ki-67 y p53 en el grupo de pacientes del Hospital Virgen de las Nieves de Granada.

3. ANALISIS DE SUPERVIVENCIA DEL GLOBAL DE LOS PACIENTES.

Se analizó el total de los pacientes con glioblastoma multiforme tratados con radioterapia y temozolamida en ambos hospitales. Sólo se pudo realizar el análisis de la supervivencia global por no disponer de las fechas de progresión en el subgrupo de pacientes de Italia.

La mediana de supervivencia global en los pacientes del grupo HVVN fue de 18 meses, frente a los 11 meses de los pacientes del grupo italiano, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 10).

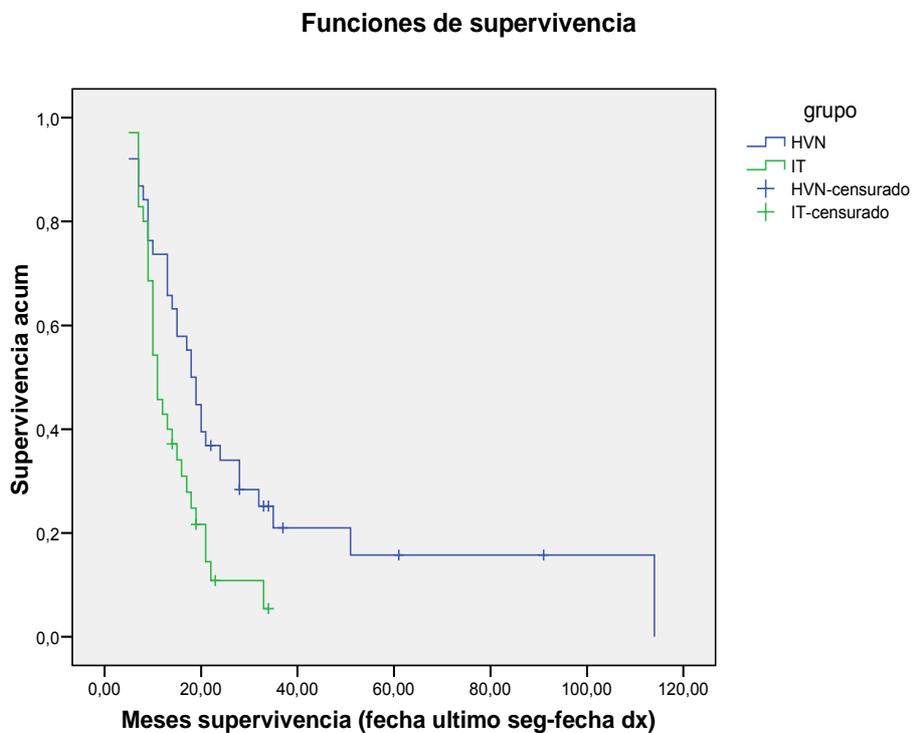


Figura 10: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el lugar de tratamiento. * $p=0,012$
Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia y metilación de MGMT. La mediana de supervivencia global fue de 13 meses en los pacientes no metilados frente a los 19 meses de los pacientes metilados. Esto demostró una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables (Figura 11).

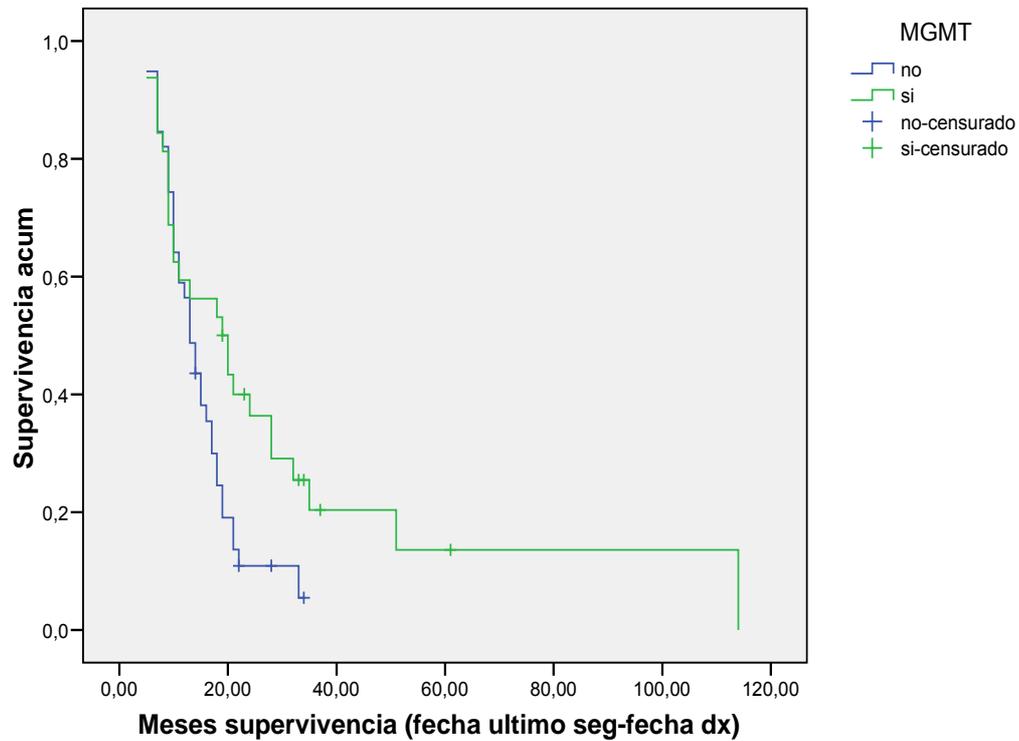


Figura 11: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el estado de metilación de MGMT. *
 $p=0,031$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia y expresión de MGMT. La mediana de supervivencia global fue de 13 meses en los pacientes con bajos niveles de proteína MGMT frente a los 12 meses de los pacientes con altos niveles de proteína MGMT, resultando ser la correlación no estadísticamente significativa (Figura 12).

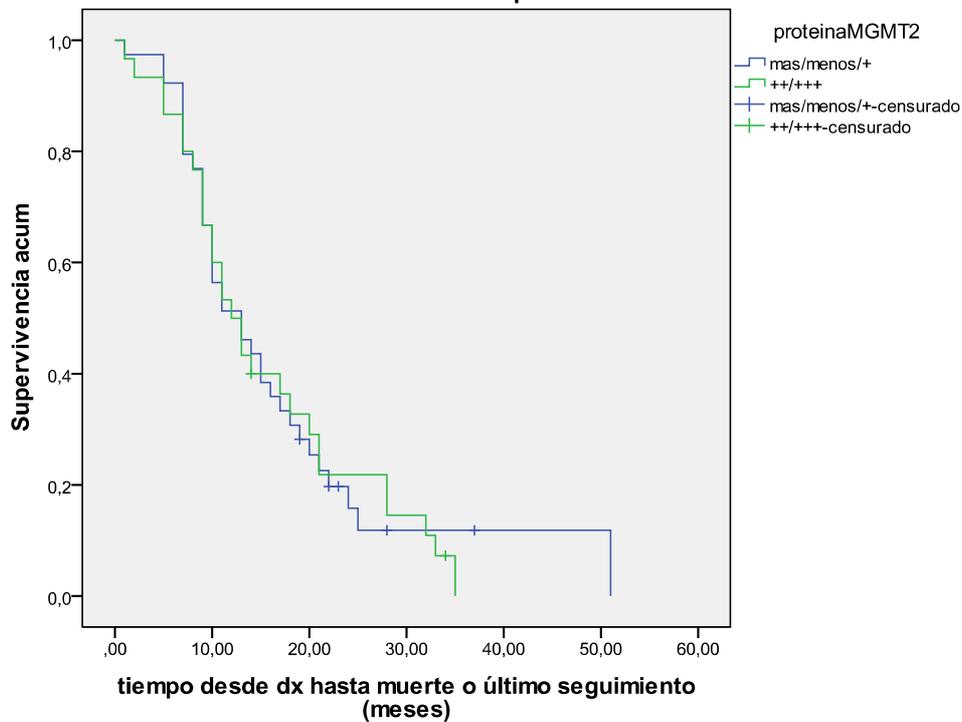


Figura 12: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según proteína MGMT. * $p=0.894$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Relación metilación-proteína MGMT. Realizamos una tabla de contingencia para ver si existía relación entre el estado de metilación de MGMT y los niveles de expresión de proteína MGMT por inmunohistoquímica, no observándose ésta ($p=0.903$). Entre los 33 pacientes con metilación de MGMT, 19 tenían baja expresión de proteína MGMT y 14 alta expresión. Entre los 43 pacientes no metilados 23 tenían baja expresión de proteína MGMT y 20 alta (Tabla 9).

			Proteína MGMT		Total
			Mas/menos/+	++/+++	
MGMT no	Recuento	23	20	43	
	% de MGMT	53,5%	46,5%	100,0%	
MGMT si	Recuento	19	14	33	
	% de MGMT	57,6%	42,4%	100,0%	
Total	Recuento	42	34	76	
	% de MGMT	55,3%	44,7%	100,0%	

Tabla 9: Tabla de contingencia Metilación MGMT – Proteína MGMT.

Supervivencia y expresión de CD133. Cuando se realizó mediante nivel de expresión de CD133 la mediana de supervivencia global fue de 14 meses en los pacientes con baja expresión de CD 133 frente a los 13 meses en los pacientes con alta expresión, y dicha correlación no fue significativa (Figura 13). Cuando se realizó mediante porcentaje de inmuno reactividad nuclear de CD133 la mediana de supervivencia global de los pacientes con expresión < 25% fue de 13 meses frente a los 15 meses de los pacientes con expresión > 25%, la correlación no fue significativa (Figura 14).

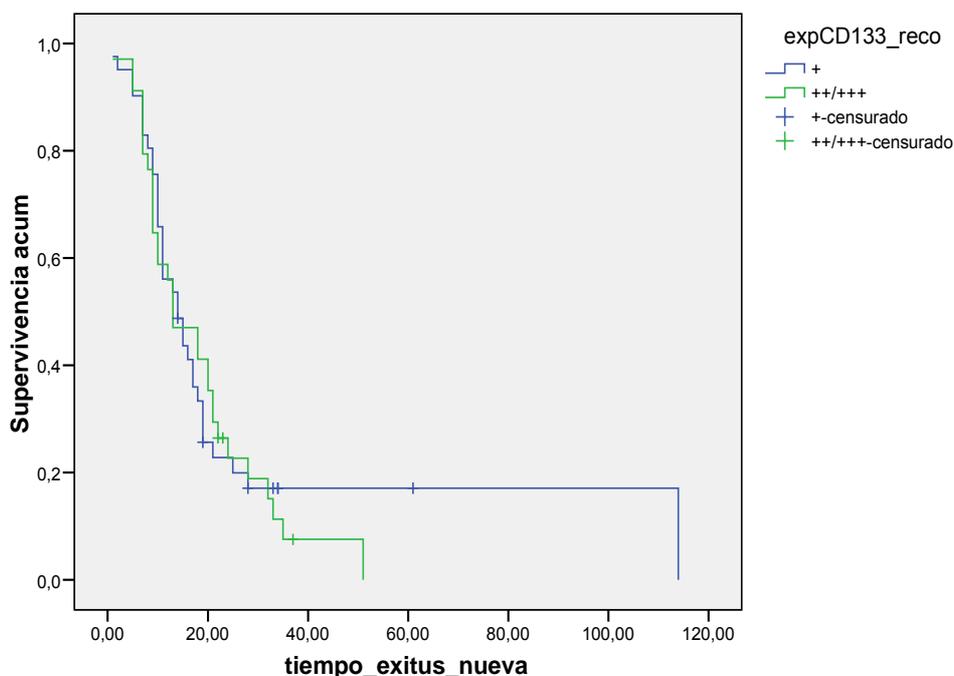


Figura 13: Curvas de supervivencia global (Kaplan-Meier) según expresión inmunohistoquímica de CD133. * p=0,787 Test de Log-Rank (Mantel-Cox).

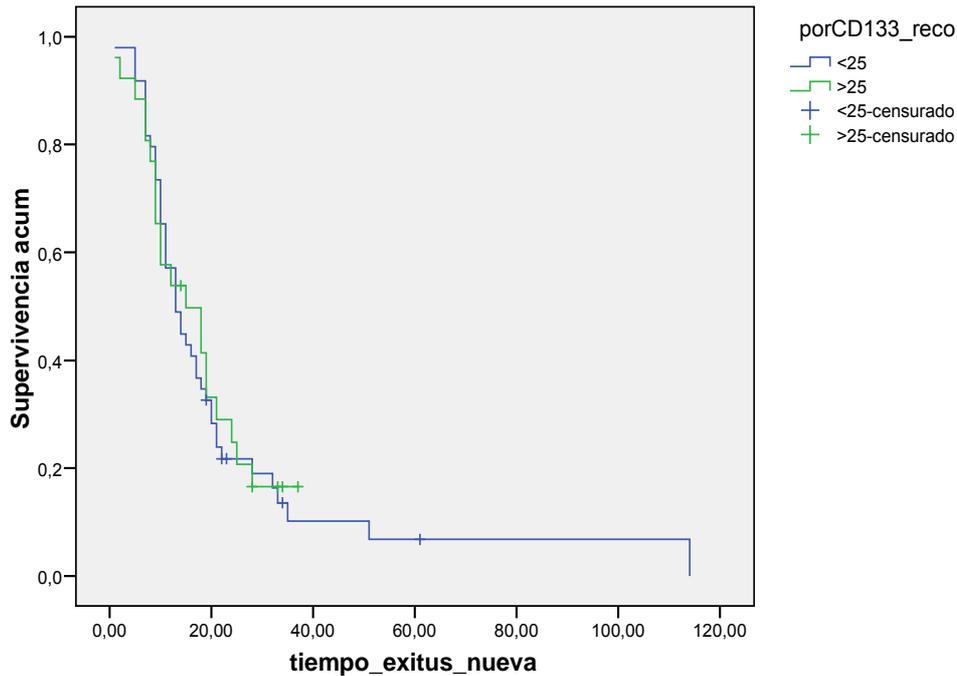


Figura 14: Curvas de supervivencia global (Kaplan-Meier) según porcentaje de inmuno reactividad nuclear de CD133. * p=0,791 Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Realizamos una tabla de contingencia para ver si existía relación entre la expresión de CD133 por inmunohistoquímica y el porcentaje de inmuno reactividad nuclear, no observándose ésta. Entre los 41 pacientes con baja expresión de CD133, 30 tenían una inmuno reactividad < 25% y 11 > 25%. Sin embargo entre los 34 pacientes con alta expresión, 19 tenían una inmuno reactividad < 25% y 15 > 25% (Tabla 10).

			% CD133				Total
			<5%	5-25%	25-75%	>75%	
Expresión CD133	+	Recuento	17	13	10	1	41
		% de Expresión CD133	41,5%	31,7%	24,4%	2,4%	100,0%
	++	Recuento	4	12	11	0	27
		% de Expresión CD133	14,8%	44,4%	40,7%	,0%	100,0%
++	Recuento	0	3	1	3	7	
	% de Expresión CD133	,0%	42,9%	14,3%	42,9%	100,0%	
Total	Recuento	21	28	22	4	75	
	% de Expresión CD133	28,0%	37,3%	29,3%	5,3%	100,0%	

Tabla 10: Tabla de contingencia Expresión CD133 – Porcentaje de Inmuno reactividad CD133

4. ANALISIS SUPERVIVENCIA GRUPO PACIENTES ITALIA.

Sólo se pudo realizar el análisis de supervivencia global por no disponer de los datos de progresión.

La mediana de supervivencia global fue de 11 meses. La supervivencia media de 14,5 meses. Todos los pacientes de este grupo tenían histología de glioblastoma multiforme, lo que explica la menor supervivencia.

La supervivencia global al año del diagnóstico es del 42,9%, a los 2 años del 10.8% y a los 5 años 0%. (Figura 15).

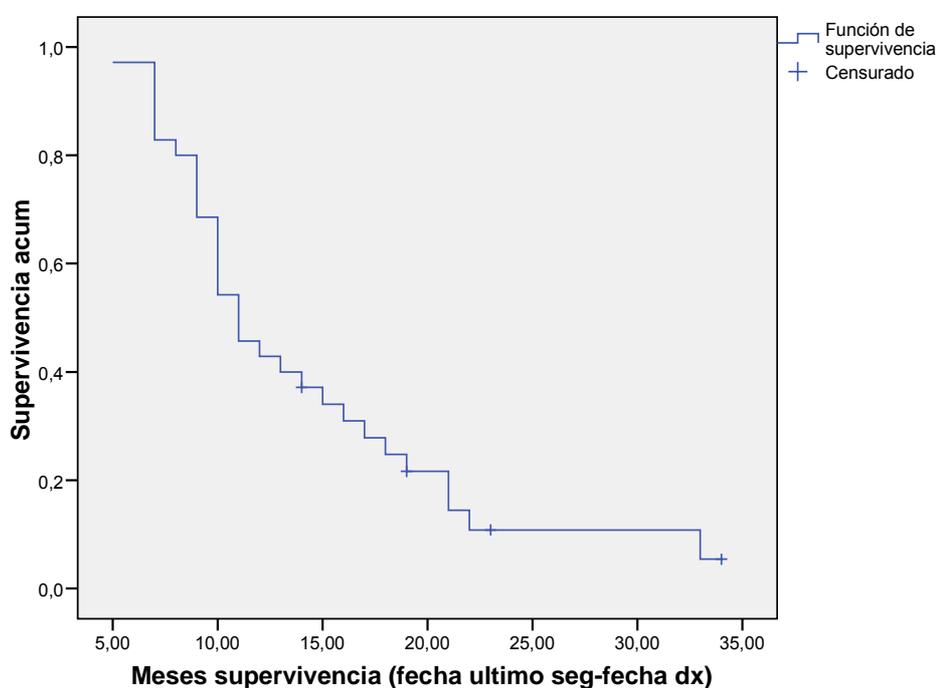


Figura 15: Supervivencia global.

Se realizó un análisis de la supervivencia global en las variables: metilación del promotor de MGMT, expresión de proteína MGMT, expresión de CD133 y % de inmuno reactividad de CD133.

Supervivencia global y metilación MGMT. La mediana de supervivencia en los pacientes con MGMT no metilado es de 12 meses, y en los pacientes con MGMT metilado de 9 meses. La correlación no fue estadísticamente significativa (Figura 16).

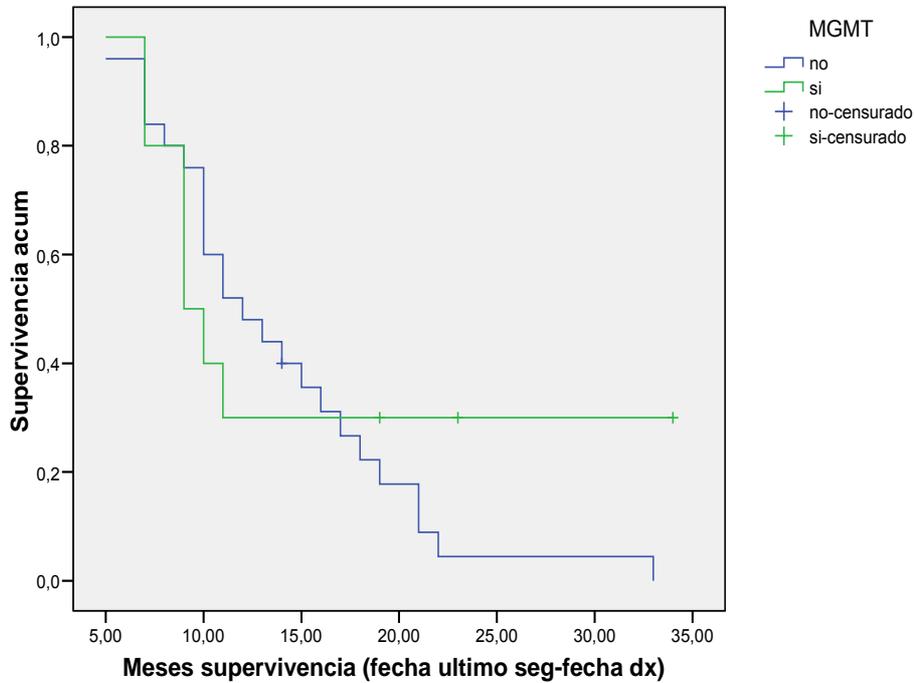


Figura 16: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el estado de metilación de MGMT. * p=0,484 Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia y expresión de MGMT. La mediana de supervivencia global fue de 10 meses en los pacientes con baja expresión, frente a los 11 meses en pacientes con alta expresión. La correlación no tuvo significación estadística (Figura 17).

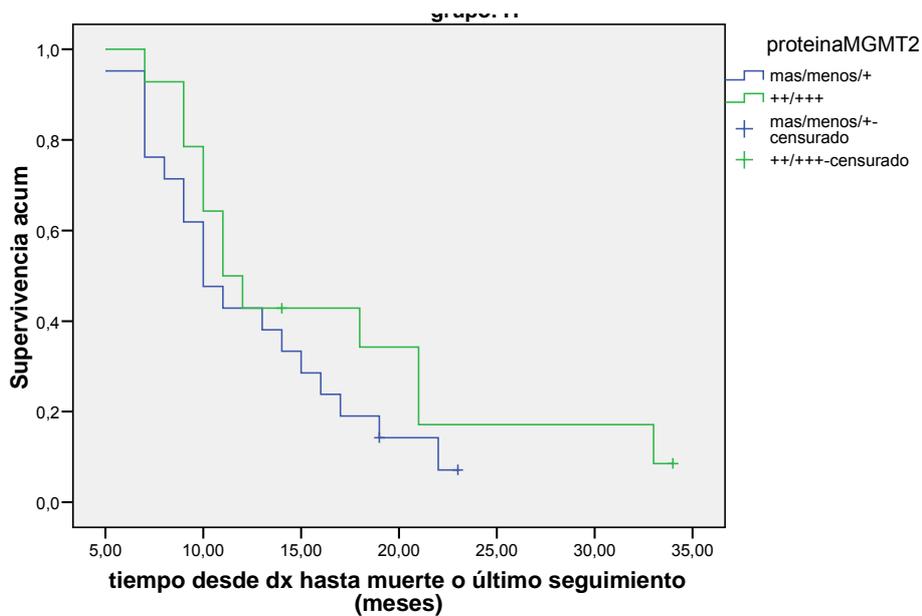


Figura 17: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según proteína MGMT. * $p=0,246$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia y expresión de CD133. Cuando se realizó mediante nivel de expresión de CD133 la mediana de supervivencia global fue de 11 meses en los pacientes con baja expresión, frente a los 10 meses en pacientes con alta expresión, la correlación no fue significativa (Figura 18). Cuando se realizó mediante porcentaje de inmuno reactividad nuclear, la mediana de supervivencia global de los pacientes con expresión $< 25\%$ fue de 11 meses frente a los 12 meses de los pacientes con expresión $> 25\%$, dicha correlación no tuvo significación estadística (Figura 19).

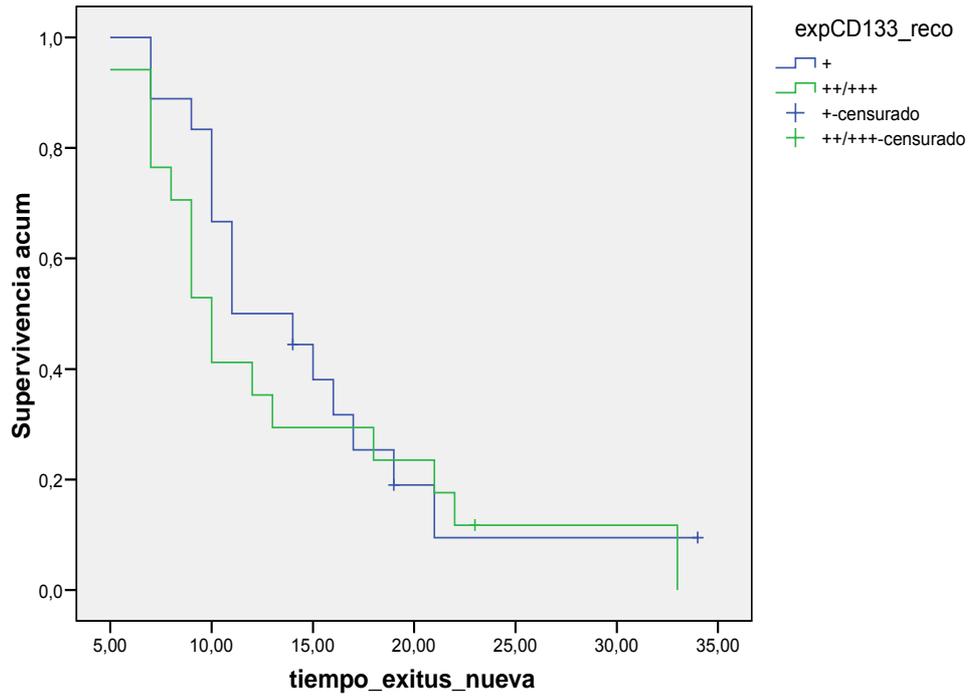


Figura 18: Curvas de supervivencia global (Kaplan-Meier) según expresión inmunohistoquímica de CD133. * $p=0,487$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

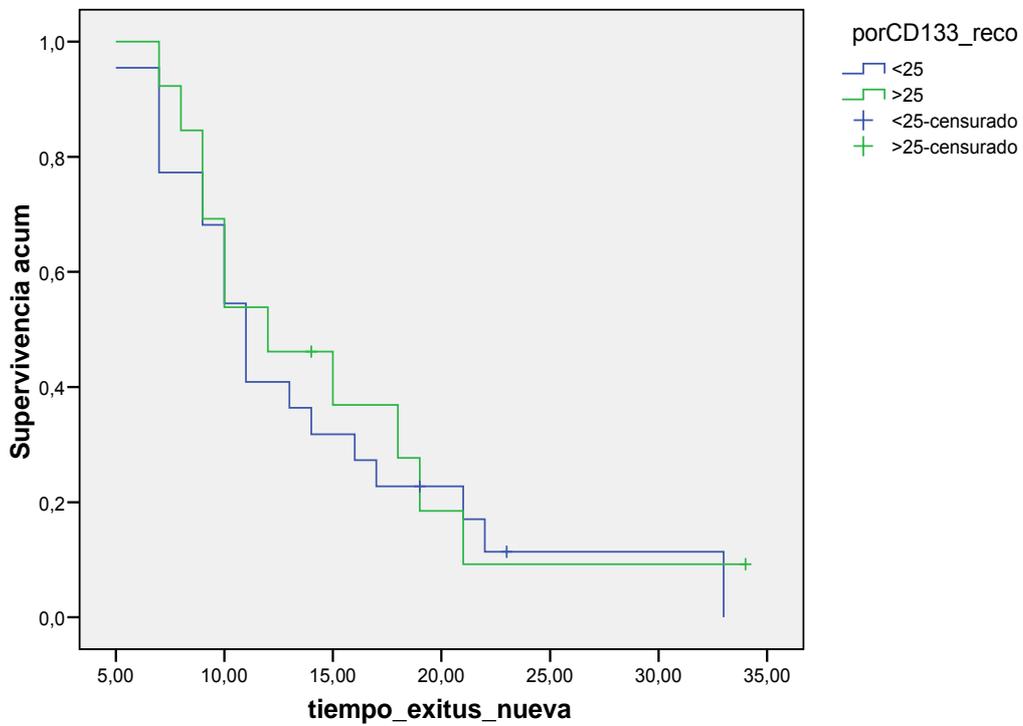


Figura 19: Curvas de supervivencia global (Kaplan-Meier) según porcentaje de inmuno reactividad nuclear de CD133. * $p=0,718$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

5. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA GRUPO PACIENTES HUVN.

5.1 Características clínicas y anatómo-patológicas (Tabla 11).

Se estudiaron de forma retrospectiva 43 pacientes diagnosticados de gliomas de alto grado entre los años 2000-2009. Veintiún pacientes eran varones (48,8%) y veintidós mujeres (51,2%). La edad media fue de 52±13 años.

El tiempo de evolución de la clínica fue menor de 3 meses en treinta y tres pacientes (76,7%) y mayor o igual a 3 meses en diez pacientes (23,3%).

En cuanto a la localización tumoral, en once pacientes afectaba al lóbulo frontal (25,6%), en siete al parietal (16,3%), en siete al temporal (16,3%), en seis al occipital (14%) y en doce afectaba a más de un lóbulo (27,9%).

Veinticuatro pacientes presentaban metilación del promotor de MGMT (55,8%), diecisiete no (39,5%) y en dos pacientes no se pudo extraer DNA (4,7%).

En cuanto a la expresión de CD133 por inmunohistoquímica fue: 25 pacientes + (58,1%), 15 pacientes ++ (34,9%) y 3 pacientes +++ (7%). Por expresión de CD133 se realizó por subgrupos: 11 pacientes < 5% (25,6%), 19 pacientes entre 5-25% (44,2%), 12 pacientes entre 25-75% (27,9%) y sólo 1 paciente tenía una expresión >75% (2,3%).

Tabla 11: Características clínicas y anatómo-patológicas.			
		Pacientes	Porcentaje
Sexo	Hombre	21	48,8%
	Mujer	22	51,2%
Edad		52±13 años	
Tiempo clínica	< 3 meses	33	76,7%
	≥ 3 meses	10	23,3%
Localización	Frontal	11	25,6%
	Parietal	7	16,3%
	Temporal	7	16,3%
	Occipital	6	14%
	Más de 1 lóbulo	12	27,9%

MGMT	Metilado	24	55,8%
	No metilado	17	39,5%
	No realizado	2	4,7%
CD133	+	25	58,10%
	++	15	34,90%
	+++	3	7,00%
CD133	< 5%	11	25,60%
	5-25%	19	44,20%
	25-75%	12	27,90%
	> 75%	1	2,30%
Proteína MGMT	Más/menos	6	14%
	+	15	34,9%
	++	9	20,90%
	+++	11	25,60%
	No realizado	2	4,7%
Ki67	< 14%	8	18,6%
	≥ 14%	26	60,5%
	No realizado	9	20,9%
P53	< 5%	7	16,4%
	≥ 5%	21	48,8%
	No realizado	15	34,8%

5.2 Características del tratamiento.

La cirugía consistió en una resección macroscópicamente completa en veinte pacientes (46,5%), una resección parcial en veintiuno (48,8%) y biopsia o resección menor del 25% en dos pacientes (4,7%).

Diez pacientes fueron sometidos a implantes de carmustina en el lecho quirúrgico (23,3%) y treinta y tres no (76,7).

Treinta y ocho pacientes recibieron tratamiento adyuvante con radioterapia y temozolamida concurrente (88,4%), cinco pacientes recibieron sólo radioterapia adyuvante (11,6%) por mal estado general, edad avanzada o co morbilidades.

Treinta y cinco pacientes recibieron temozolamida adyuvante (81,4%), ocho no (18,6%). La mediana de ciclos recibidos fue de 6 (rango de 0-29).

Además algunos pacientes recibieron tratamientos diferentes posteriores: 10 pacientes fueron reintervenidos, 9 pacientes realizaron radio cirugía y 18 pacientes recibieron quimioterapia de 2º línea (5 temozolamida pauta estándar, 6 temozolamida pauta diaria, 7 otros fármacos).

El tratamiento fue bien tolerado. Solo destacar un 8,1% de trombopenia grado 4, un 2,7% de neutropenia afebril grado 3 y un 2,7% de emesis grado 3. (Según la clasificación de la toxicidad del NCI-CTC versión 3.0).

Sólo tres pacientes precisaron reducción de la dosis (8,1%).

5.3 Respuesta al tratamiento.

Tras el tratamiento se evaluó la respuesta clínica y radiológica, de los 38 pacientes que recibieron radioterapia-temozolamida:

- Respuesta clínica: 18 pacientes (47,4%) se evaluaron como progresión tumoral (PT), 3 pacientes (7,9%) presentaron estabilización tumoral (EE), 6 pacientes (15,8%) obtuvieron una respuesta parcial (RP) y 11 pacientes (28,9%) consiguieron una respuesta completa (RC). (Figura 20).

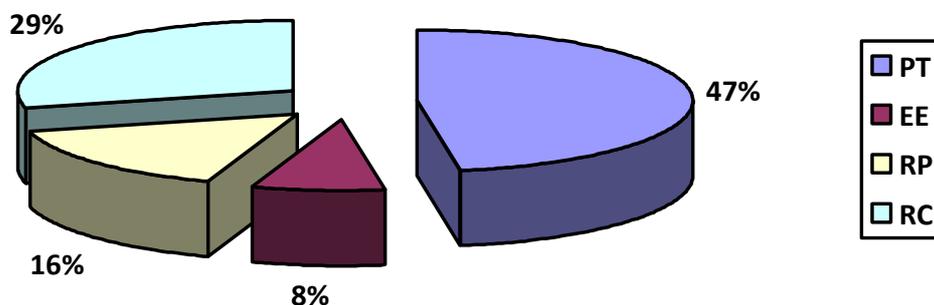


Figura 20: Tasa de respuestas clínicas.

- Respuestas radiológicas: 22 pacientes (61,1%) se evaluaron como progresión tumoral (PT), 4 pacientes (11,1%) presentaron estabilización tumoral (EE), 6 pacientes (16,7%) obtuvieron una respuesta parcial (RP) y 4 pacientes (11,1%) consiguieron una respuesta completa (RC), 2 pacientes no se reevaluaron radiológicamente (considerados perdidos por el sistema). (Figura 21).

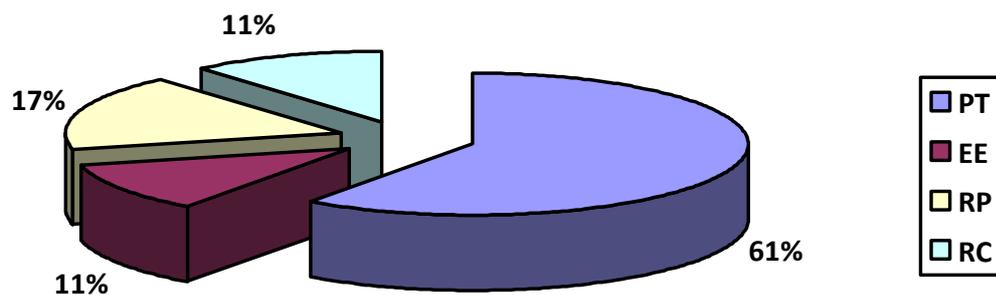


Figura 21: Tasa de respuestas radiológicas.

5.4 Supervivencia global.

La mediana de supervivencia global fue de 18 meses. La supervivencia media de 33,5 meses.

Con respecto al estado actual de los pacientes en el momento del análisis; 31 fueron exitus, 5 permanecían vivos con enfermedad y 2 vivos sin evidencia de enfermedad. La supervivencia global al año del diagnóstico es del 73,7%, a los 2 años del 34% y a los 5 años del 15,7%. (Figura 22).

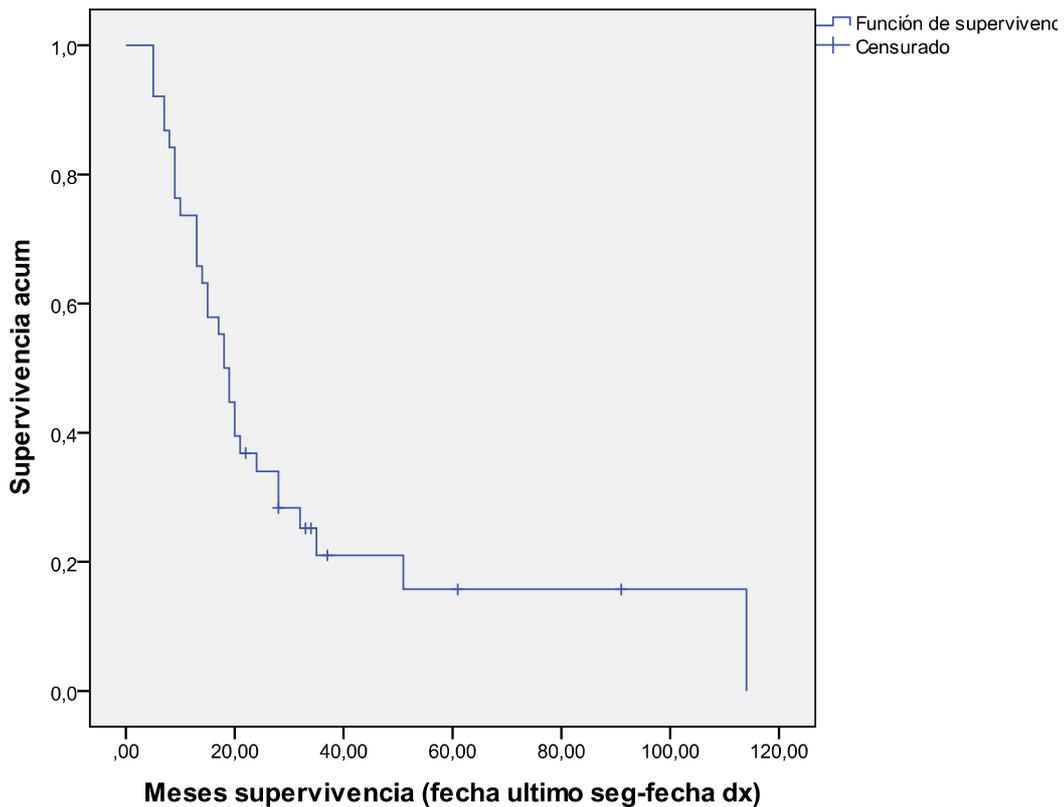


Figura 22: Supervivencia global.

Se realizó un análisis de la supervivencia global según el resto de las variables: sexo, edad, tiempo de evolución de la clínica, implantes de carmustina, temozolamida adyuvante, metilación del promotor de MGMT, expresión de proteína MGMT, expresión de CD133, Ki67 y p53.

No hubo diferencias significativas en función del sexo (Figura 23), el tiempo de evolución de la clínica (Figura 24), los implantes de carmustina (Figura 25), el haber recibido Temozolamida adyuvante (Figura 27), la expresión de proteína MGMT (Figura 29), el porcentaje de expresión IHQ de CD133 (Figura 31), ki67 (Figura 32) ni p53 (Figura 33).

Sí hubo diferencias significativas en función de la edad (Figura 26, mayor supervivencia en los menores o iguales de 50 años), el estado de metilación de MGMT (Figura 28, mayor supervivencia en los pacientes metilados) y la expresión inmunohistoquímica de CD133 (Figura 30).

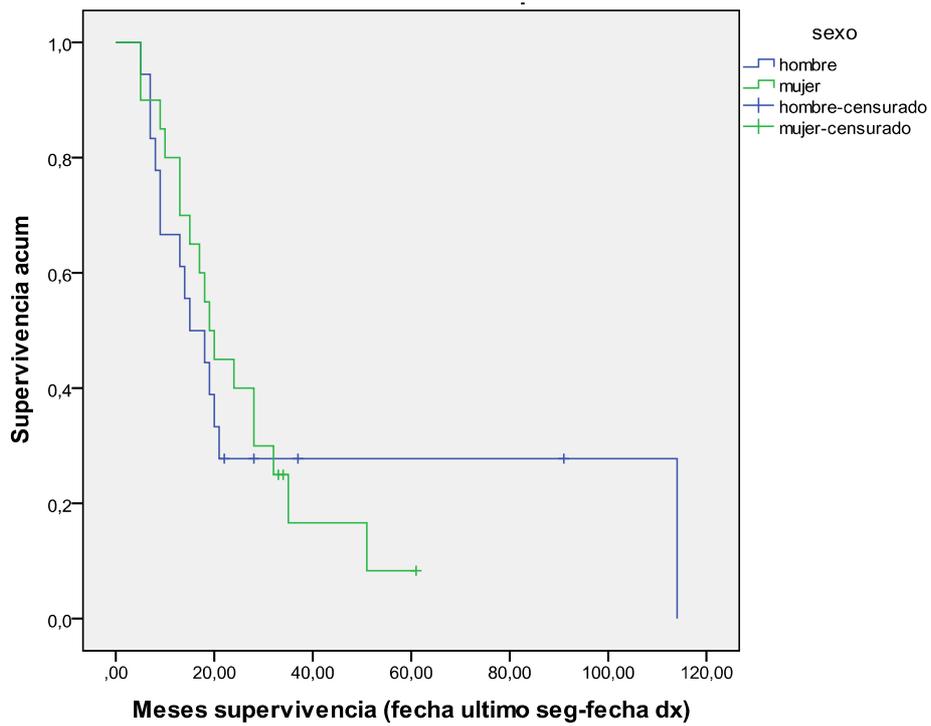


Figura 23: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el sexo. * $p=0,931$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

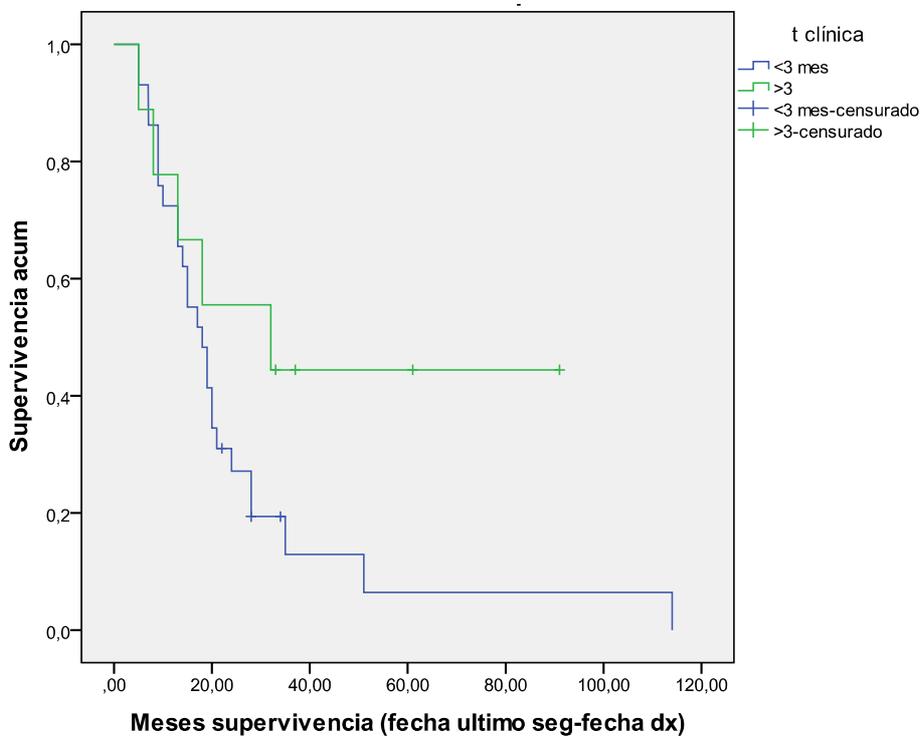


Figura 24: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el tiempo de evolución de la clínica. * $p=0,107$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia global e implantes de carmustina. La mediana de supervivencia fue 17 meses en los pacientes que no recibieron implantes de carmustina frente a los 13 meses de los que si lo recibieron, no siendo esta correlación en este subgrupo estadísticamente significativa (Figura 25).

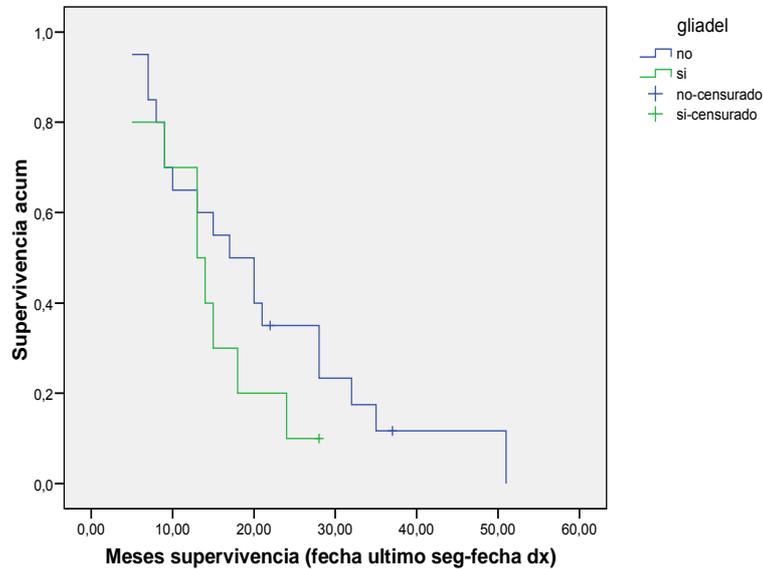


Figura 25: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según la implantación de carmustina. * $p=0,253$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia global y edad. La mediana de supervivencia en los pacientes ≤ 50 años fue de 20 meses en comparación con los 13 meses de los $>$ de 50 años. La correlación fue estadísticamente significativa (Figura 26).

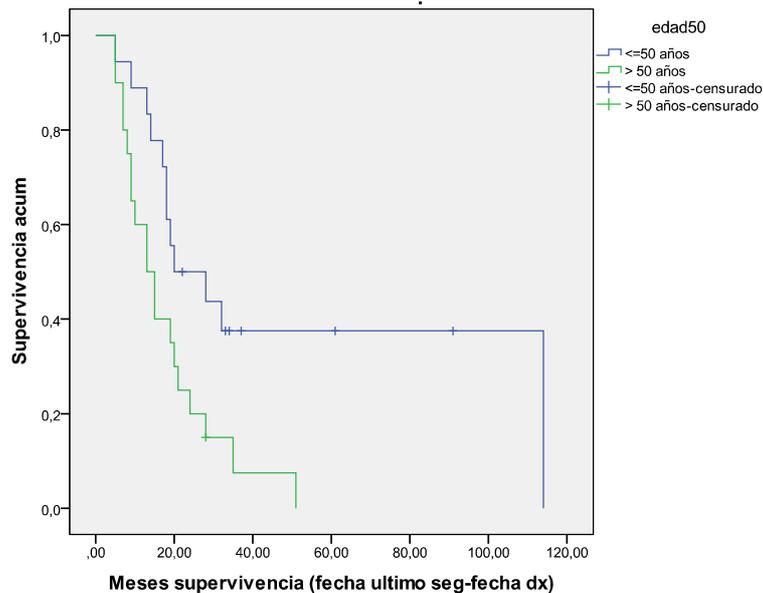


Figura 26: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según la edad. * $p=0,013$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia global y TMZ adyuvante. La mediana de supervivencia en los pacientes que recibieron temozolamida adyuvante fue de 18 meses en comparación con los 5 meses de los que no la recibieron; a pesar de esta diferencia la correlación no fue estadísticamente significativa (Figura 27).

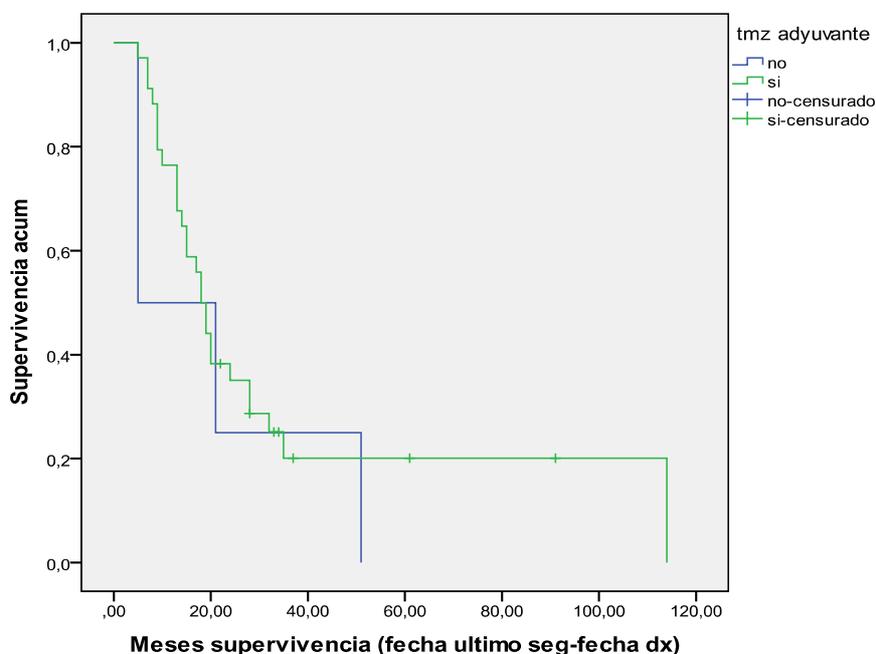


Figura 27: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según TMZ adyuvante. * $p=0,457$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia global y metilación de MGMT. La mediana de supervivencia fue de 13 meses en los pacientes no metilados frente a los 21 meses de los pacientes metilados. La correlación fue estadísticamente significativa (Figura 28).

Supervivencia global y expresión de MGMT. La mediana de supervivencia fue de 15 meses en los pacientes con bajos niveles de proteína MGMT frente a los 13 meses de los pacientes con altos niveles de proteína MGMT. La correlación no tuvo significación estadística (Figura 29).

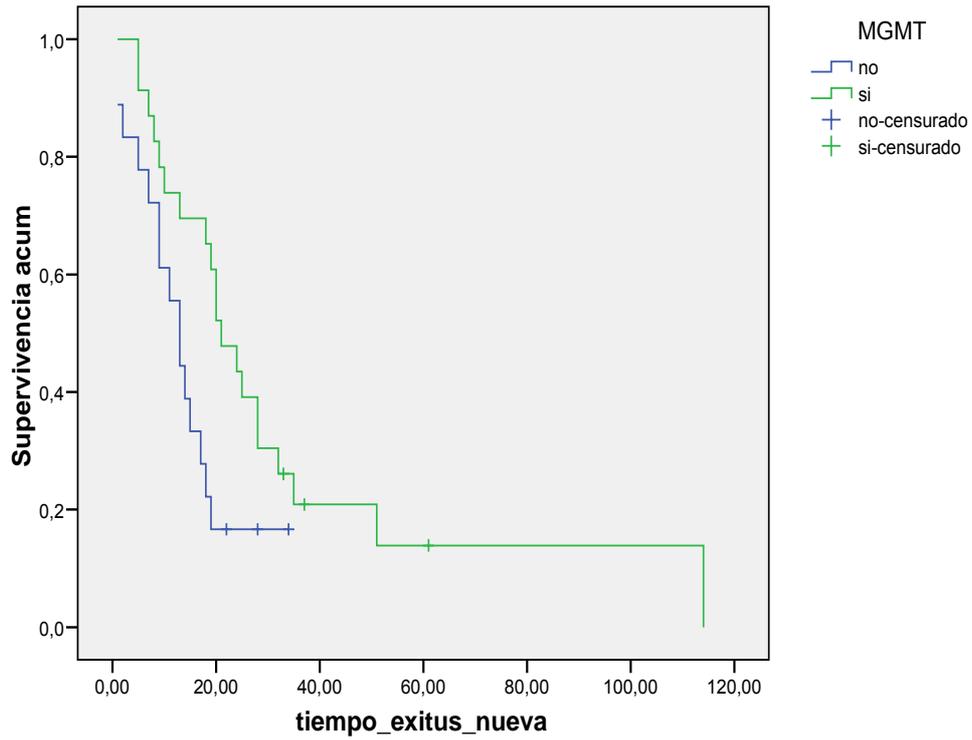


Figura 28: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el estado de metilación de MGMT. * $p=0,043$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

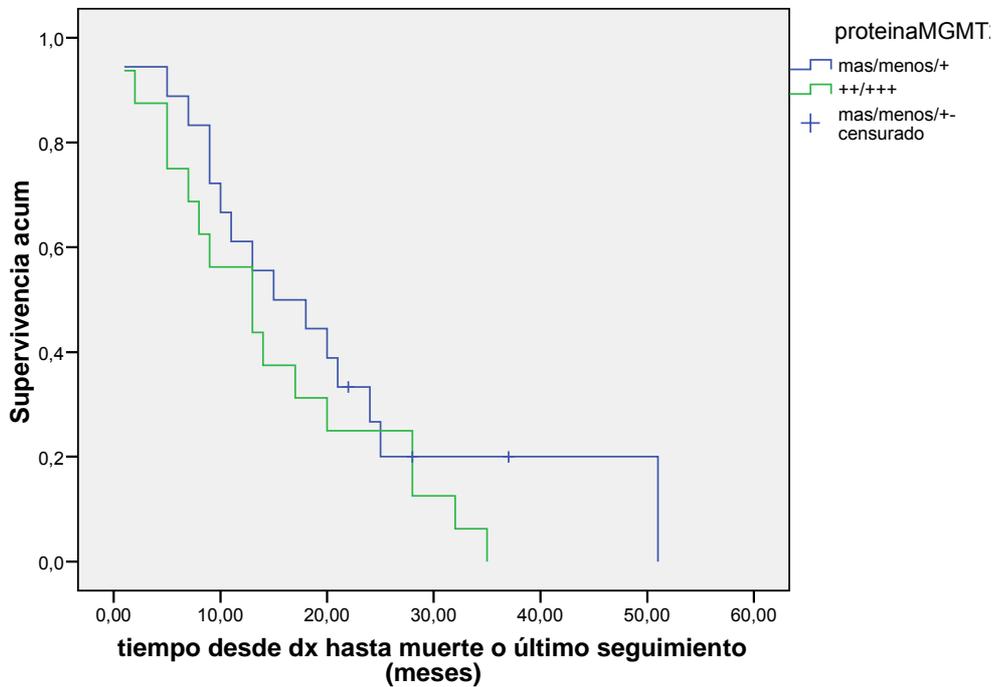


Figura 29: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según proteína MGMT. * $p=0,260$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia global y expresión de CD133. Cuando se realizó mediante nivel de expresión de CD133, la mediana de supervivencia fue de 13 meses en los pacientes con expresión baja de CD133 (+) frente a los 20 meses del grupo de pacientes con expresión alta (++) y dicha correlación fue significativa (Figura 30). Cuando se realizó mediante porcentaje de inmunoreactividad nuclear, la mediana de supervivencia de los pacientes con expresión < 25% fue de 15 meses frente a los 24 meses de los pacientes con expresión > 25%, la correlación no fue significativa (Figura 31).

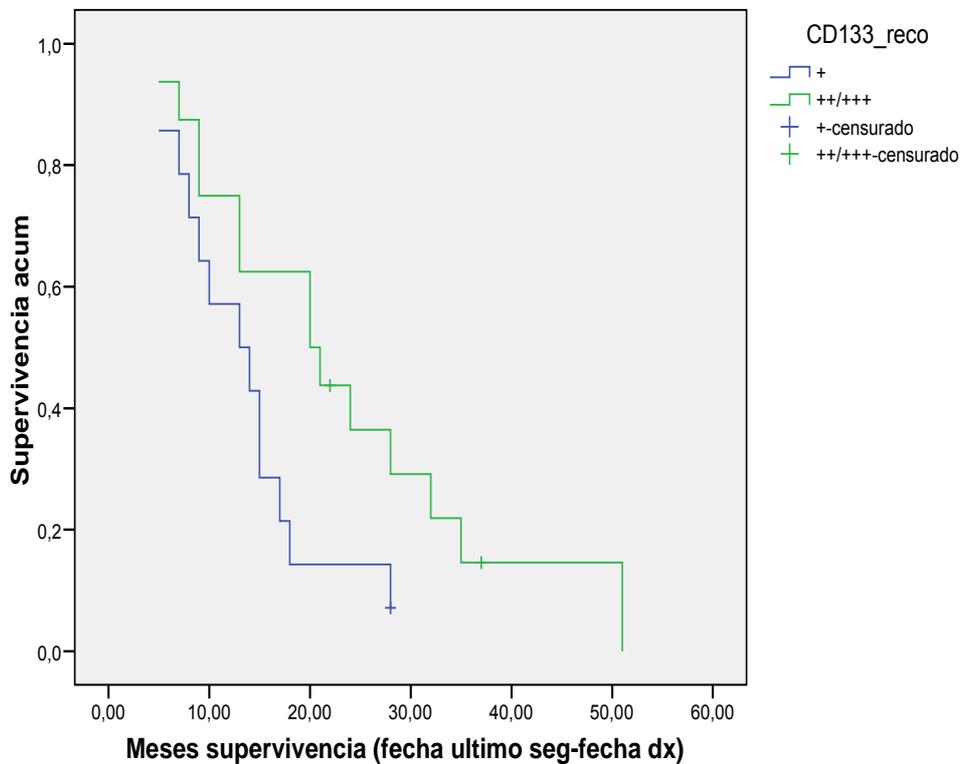


Figura 30: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según expresión inmunohistoquímica de CD133. * $p=0,05$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

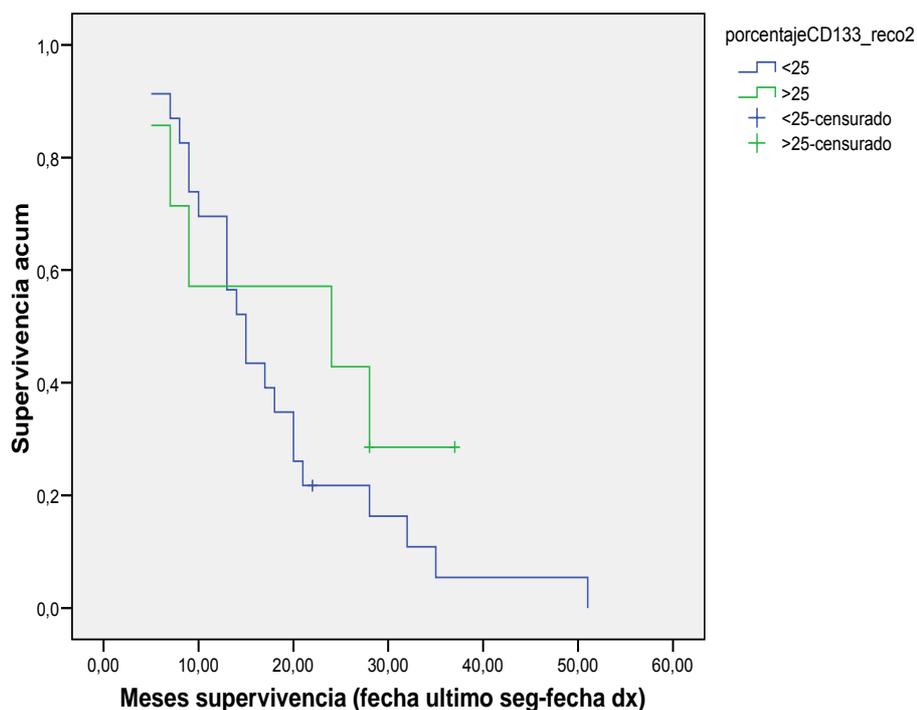


Figura 31: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según porcentaje de inmuno reactividad nuclear de CD133. * $p=0,333$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia global y Ki-67. Usando como punto de corte el percentil 25 de expresión la mediana de supervivencia de los pacientes con expresión de Ki67 $< 14\%$ fue de 19 meses frente a los 13 meses de los pacientes con expresión $\geq 14\%$, aunque la correlación no alcanzó la significación estadística (Figura 32).

Supervivencia global y p53. Usando como punto de corte el percentil 50 de expresión de p53 la mediana de supervivencia de los pacientes con expresión $< 5\%$ fue de 18 meses frente a los 13 meses de los pacientes con expresión $\geq 5\%$, La correlación no fue significativa (Figura 33).

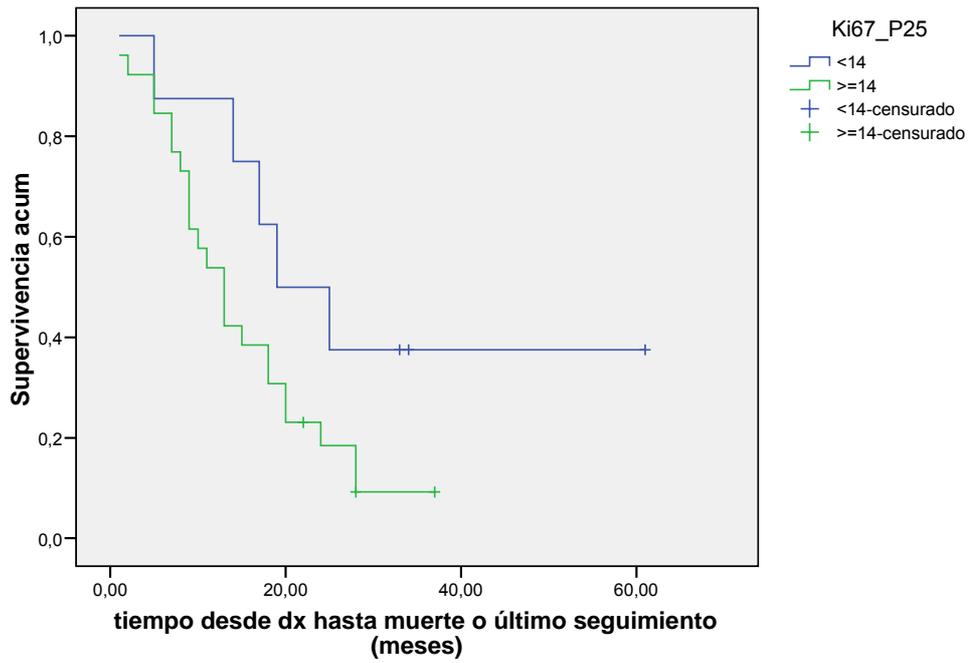


Figura 32: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según Ki67 < o ≥ 14%. * p=0,090 Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

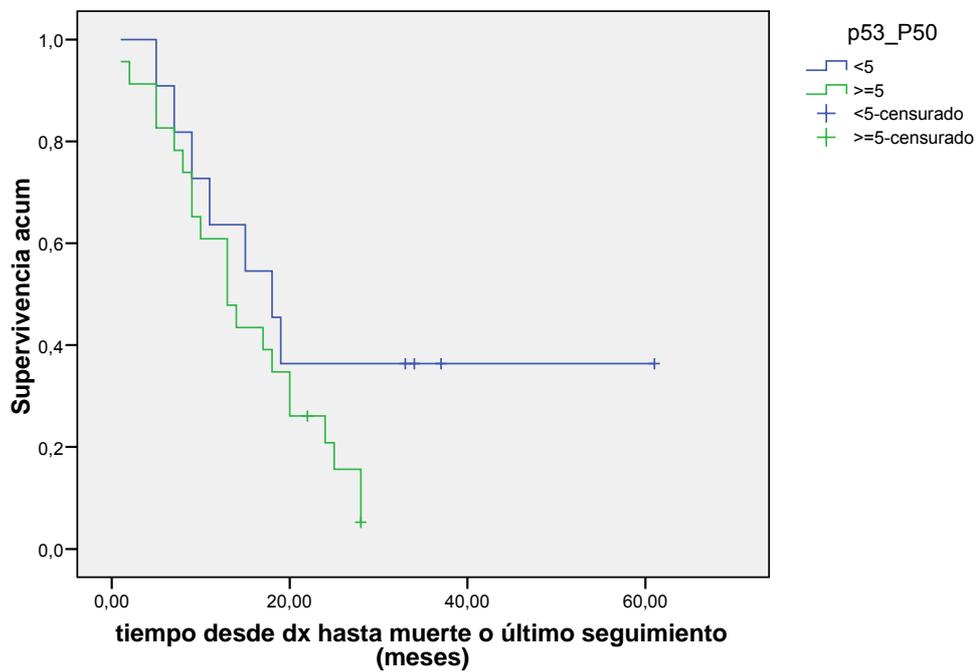


Figura 33: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según p53 < o ≥ 5%. * p=0,148 Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

5.5 Supervivencia libre de progresión.

La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 8 meses. La supervivencia libre de progresión al año del diagnóstico fue del 39,5%, a los 2 años del 21,1% y a los 5 años del 9,8%. (Figura 34).

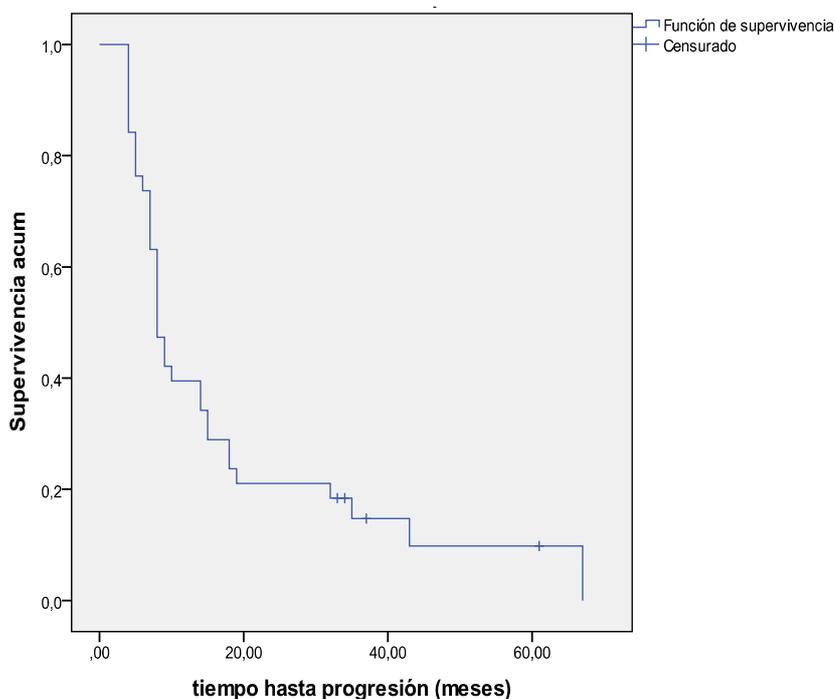


Figura 34: Supervivencia libre de progresión.

Se realizó un análisis de la supervivencia libre de progresión según el resto de las variables: sexo, edad, tiempo de evolución de la clínica, implantes de carmustina, temozolamida adyuvante, estirpe histológica, metilación del promotor de MGMT, proteína MGMT, expresión de CD133.

No hubo diferencias significativas en función del sexo, el haber recibido temozolamida adyuvante, la expresión de proteína MGMT (Figura 39), la expresión de CD133 (Figuras 40 y 41), Ki 67 (Figura 42), ni p53 (figura 43).

Sí hubo diferencias significativas en función de la edad (Figura 35, mayor supervivencia en los menores o iguales de 50 años), el tiempo de evolución de la clínica (Figura 36), el haber recibido implantes de carmustina (Figura 37) y el estado de metilación de MGMT (Figura 38).

Supervivencia libre de progresión y edad. La mediana de supervivencia libre de progresión en los pacientes ≤ 50 años fue de 15 meses en comparación con los 8 meses de los $>$ de 50 años. La correlación mostró significación estadística (Figura 35).

Supervivencia libre de progresión y tiempo de evolución de la clínica. La supervivencia libre de progresión en los pacientes con un tiempo de evolución de la clínica ≤ 3 meses fue de 8 meses en comparación con los 32 meses de los > 3 meses. La correlación fue estadísticamente significativa (Figura 36).

Supervivencia libre de progresión e implantes de carmustina. En este subgrupo las diferencias fueron estadísticamente significativas, siendo la supervivencia libre de progresión de 8 meses en los pacientes que no recibieron carmustina frente a los 5 meses de los pacientes que sí los recibieron (Figura 37).

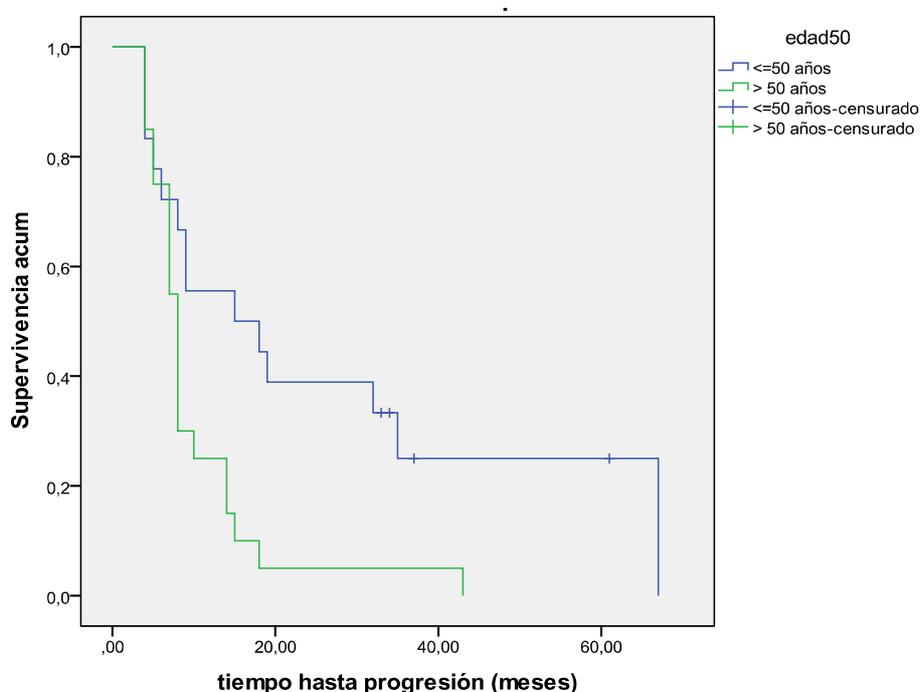


Figura 35: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según la edad. * $p=0,011$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

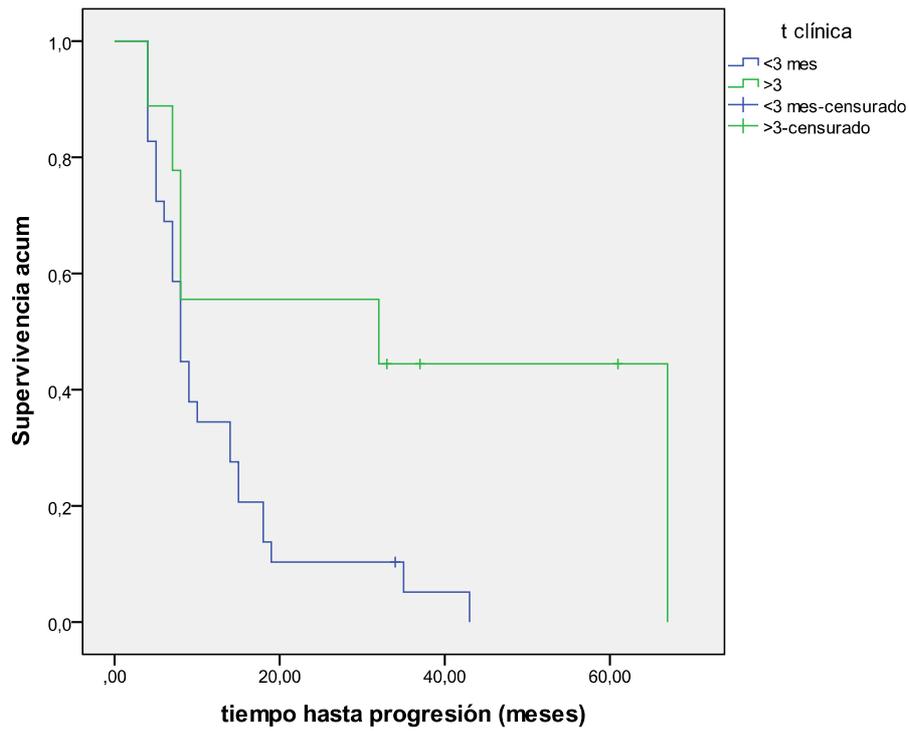


Figura 36: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según el tiempo de evolución de la clínica. * $p=0,016$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

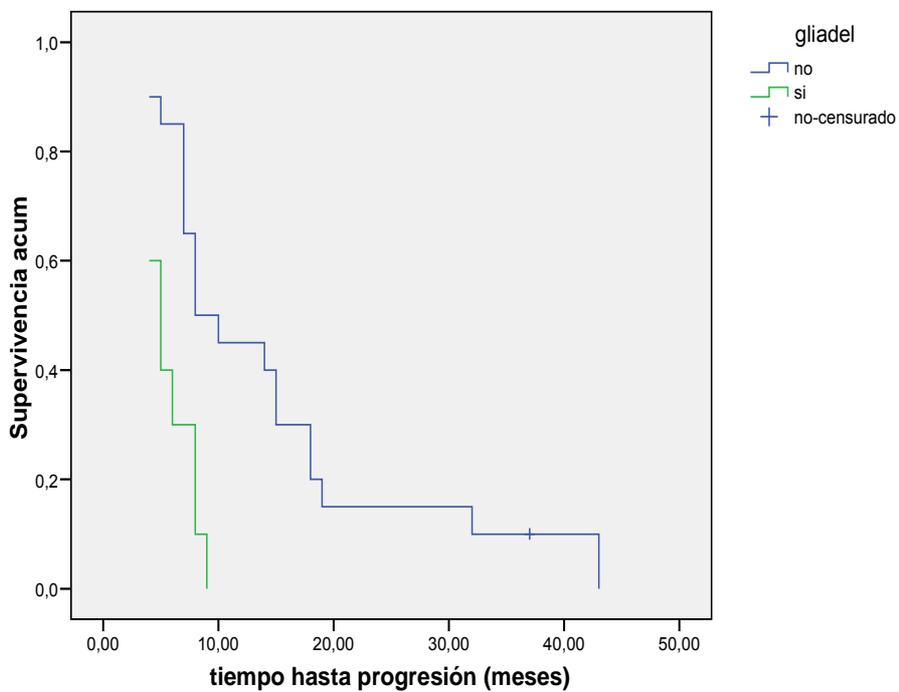


Figura 37: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según los implantes de carmustina. * $p=0,001$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia libre de progresión y metilación de MGMT La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 8 meses en los pacientes metilados frente a los 6 meses de los no metilados. La correlación mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 38).

Supervivencia libre de progresión y expresión de MGMT. La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 7 meses en ambos grupos. La correlación no fue estadísticamente significativa (Figura 39).

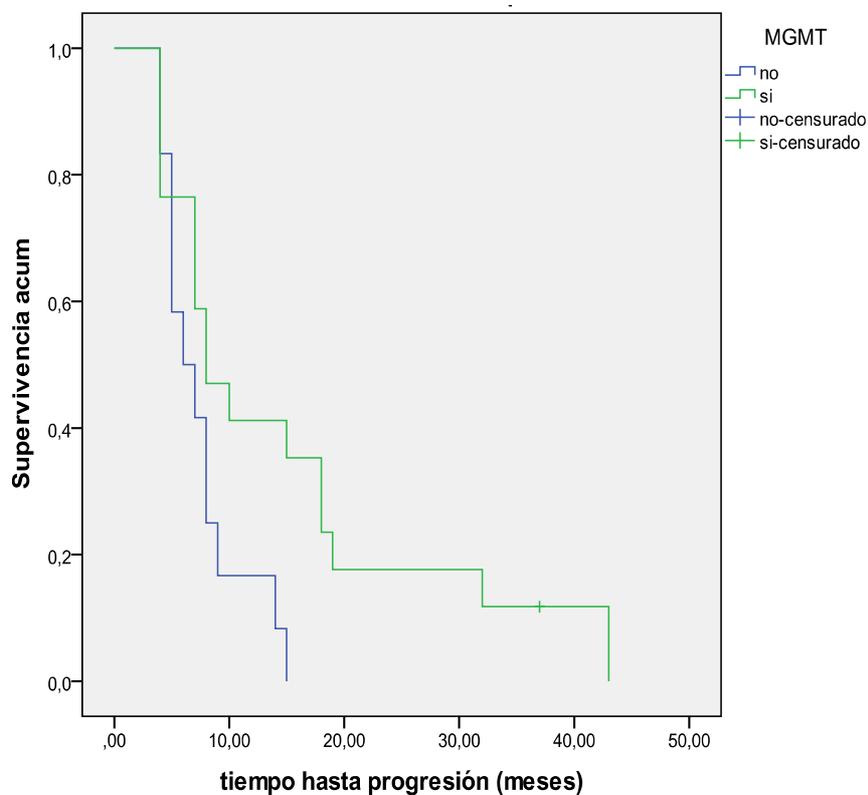


Figura 38: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según el estado de metilación de MGMT. * $p=0,036$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

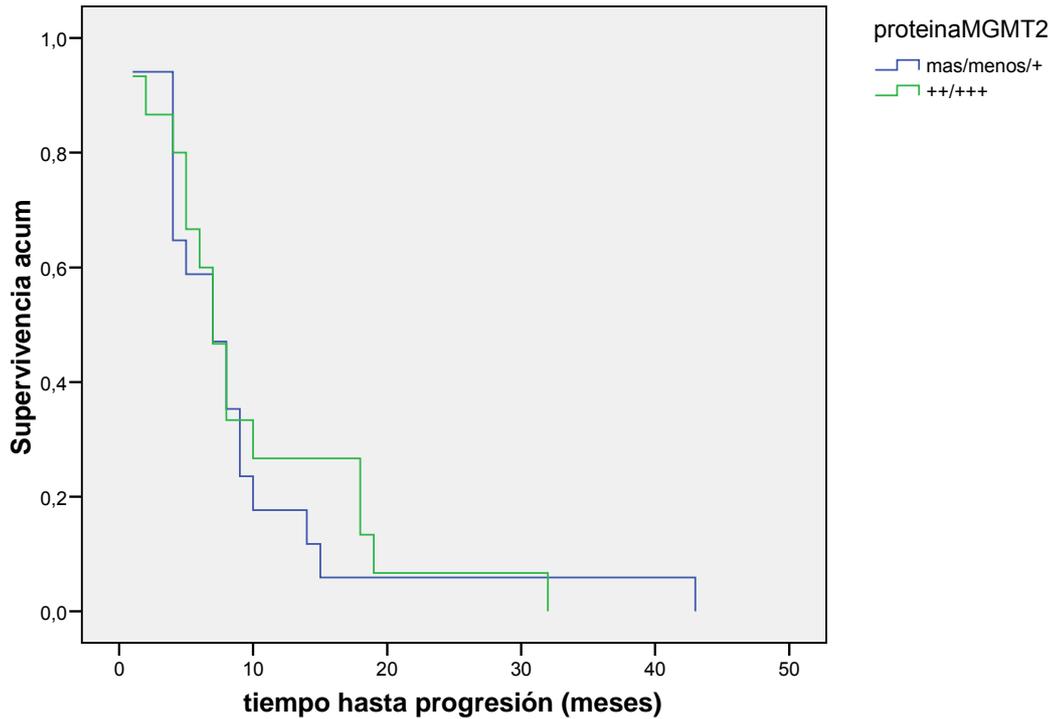


Figura 39: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según proteína MGMT.
 * p=0,712 Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia libre de progresión y expresión de CD133. Cuando se realizó mediante nivel de expresión de CD133, la mediana de supervivencia libre de progresión fue de 7 meses en los pacientes con baja expresión de CD133 (+) frente a los 8 meses de los que tenían alta expresión (++/+++), no siendo la correlación estadísticamente significativa (Figura 40). Cuando se realizó mediante porcentaje de inmuno reactividad nuclear de CD133, la mediana de supervivencia libre de progresión de los pacientes con expresión < 25% fue de 8 meses frente a los 7 meses de los pacientes con expresión > 25%, la correlación no fue estadísticamente significativa (Figura 41).

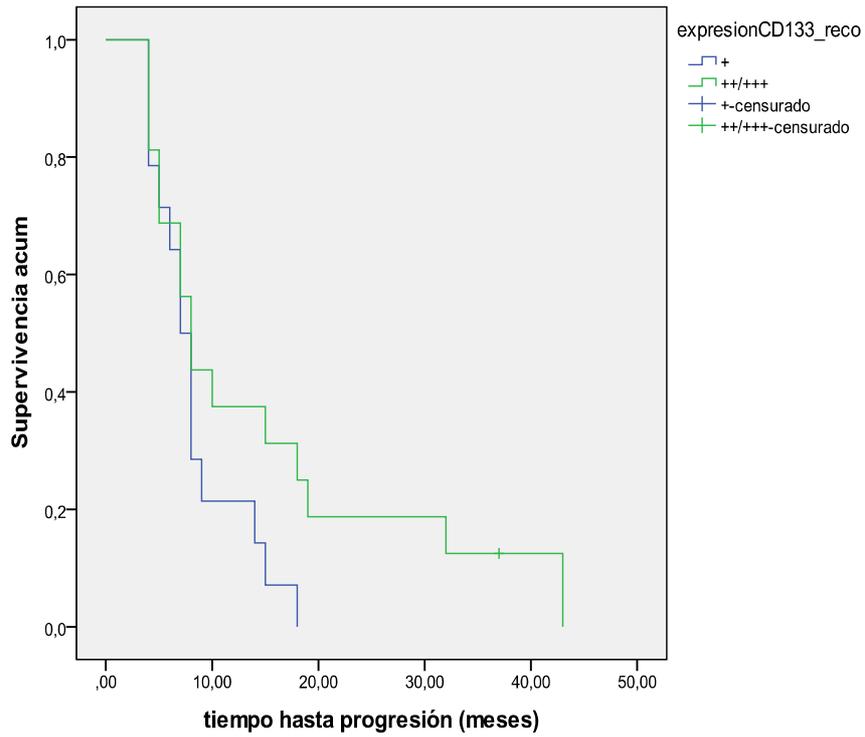


Figura 40: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según expresión inmunohistoquímica de CD133. * $p=0,118$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

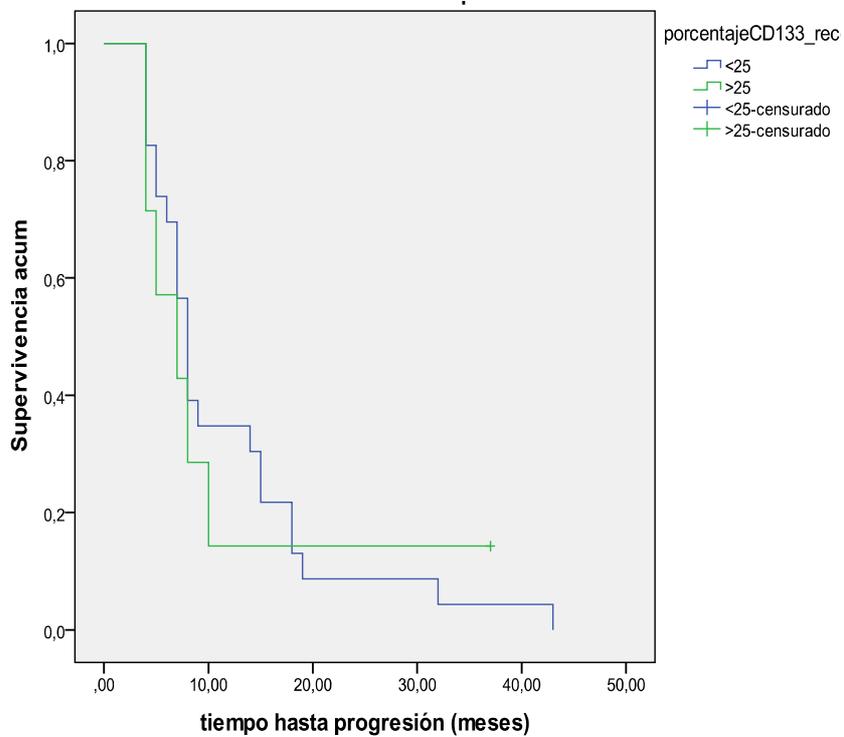


Figura 41: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según porcentaje de inmuno reactividad nuclear de CD133. * $p=0,843$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia libre de progresión y Ki-67. Usando como punto de corte el percentil 25 de expresión de Ki67 la mediana de supervivencia libre de progresión de los pacientes con expresión $< 14\%$ fue de 6 meses frente a los 7 meses de los pacientes con expresión $\geq 14\%$. La correlación no fue estadísticamente significativa (Figura 42).

Supervivencia libre de progresión y p53. La mediana de supervivencia libre de progresión de los pacientes con expresión $< 5\%$ fue de 8 meses frente a los 7 meses de los pacientes con expresión $\geq 5\%$, dicha correlación no fue significativa (Figura 43).

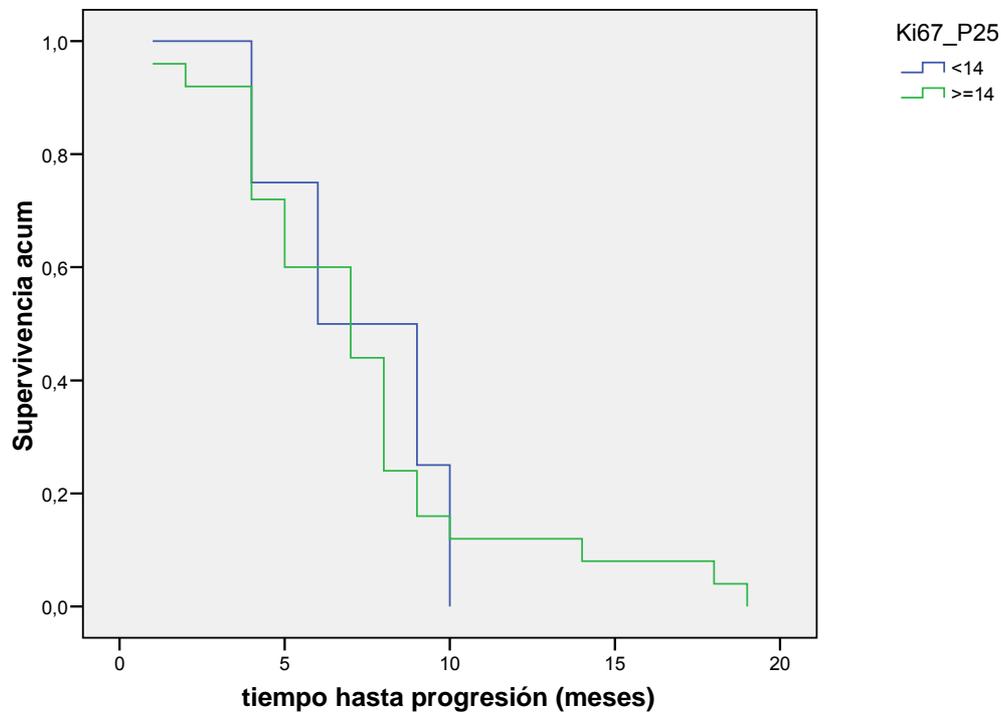


Figura 42: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según expresión de Ki67 $< 14\%$ o $\geq 14\%$. * $p=0,925$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

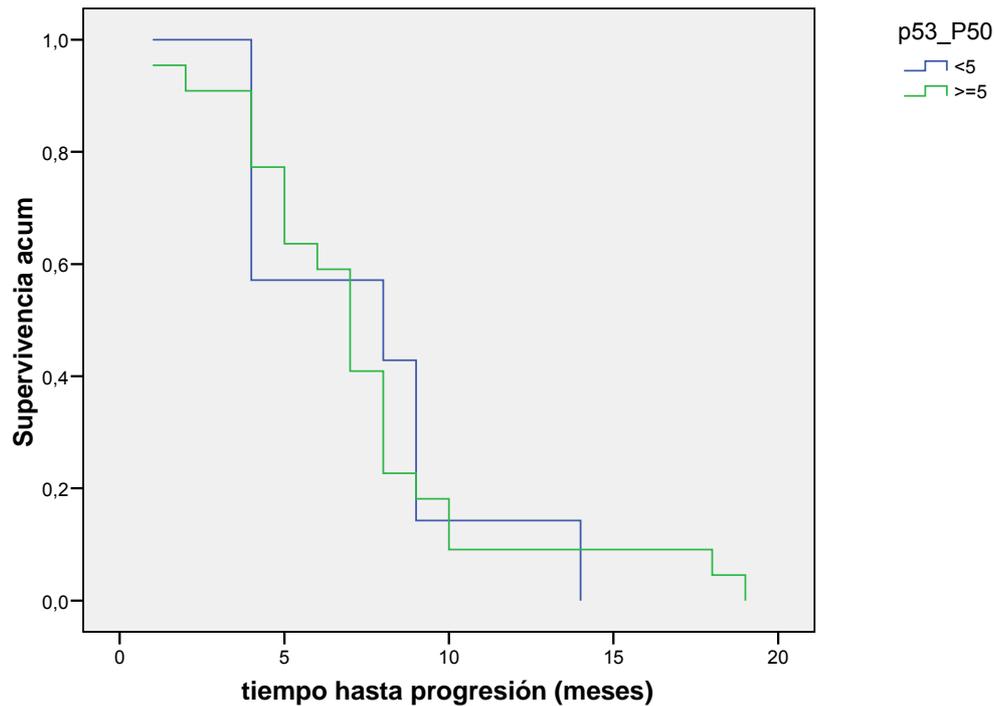


Figura 43: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según expresión de p53 <math>< 0 \geq 5\%</math>. * $p=0,930$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

5.6 Análisis univariable y multivariable de supervivencia.

En el análisis univariable se objetivó una significativa correlación con menor supervivencia global (SG) en los pacientes > 50 años, MGMT no metilado, y baja expresión de CD133. Se objetivó menor supervivencia libre de progresión (SLP) en los pacientes > 50 años, con un tiempo de evolución de la clínica < 3 meses, que habían recibido implantes de carmustina y MGMT no metilado (Tabla 12).

Variable	SG meses			SLP meses		
	Mediana	IC 95%	p*	Mediana	IC 95%	p*
Edad						
< 50	20	2.4-37.6	0.013	15	0-33.7	0.011
> 50	13	7.5-18.5		8	7.2-8.8	
Sexo			0.931			0.365
Hombre	15	6.7-23.3		7	5.9-8	
Mujer	19	14.6-23.4		9	3.1-14.8	
T clínica			0,107			0.016
< 3 m	18	12.7-23.3		8	6.7-9.3	
> 3 m	32	0-73		32	0-102.1	
TMZ adyuv			0.457			0.492
Si	18	15.1-20.9		8	6.9-9	
No	5	-		4	-	
Carmustina			0.253			0.001
Si	13	7.8-18.1		5	3.4-6.5	
No	17	9.6-24.3		8	4.7-11.2	
Met MGMT			0.043			0.036
Si	21	15.1-26.8		8	3.9-12.0	
No	13	8.8-17.3		6	2.6-9.3	
Prot MGMT			0.260			0.712
Baja	15	4.6-25.4		7	4-10	
Alta	13	5.2-20.8		7	5.1-8.9	
Expr CD133			0.05			0.118
Bajo	13	5.7-20.3		7	7.2-10.8	
Alto	20	9.5-30.5		8	6.7-9.3	
% CD133			0.333			0.843
< 25%	15	11.9-18.1		8	0-17.7	
> 25%	24	0-62.5		7	6.5-9.5	
% Ki 67			0.090			0.925
< 14%	19	7.9-30		6	1.1-10.9	
≥ 14%	13	9.3-16.7		7	4.6-9.4	
% p53			0.148			0.930
< 5%	18	9.4-26.6		8	0-18.2	
≥ 5%	13	8.3-17.7		7	5.9-8.1	

* p mediante test de log-rank.

Tabla 12: Análisis univariable de SG y SLP.

Se realizó un análisis por regresión de Cox, para estudiar de forma simultánea las variables relacionadas con la mortalidad. Se consideró como variable dependiente el tiempo desde fecha diagnóstico hasta la muerte o último seguimiento, y como estado el exitus. Se utilizó el método de selección de variables de Razón de Verosimilitudes hacia delante, considerando todas las variables que resultaron relacionadas con la supervivencia global. Las variables que quedan en el modelo relacionadas con la mortalidad son (Tabla 13):

- La edad, que actúa como factor de riesgo, OR para la edad: 2.498 (1.218-5.123). Los pacientes con más de 50 años tienen 2.49 veces más riesgo de exitus que los de menos de 50.
- La metilación MGMT, como factor protector, OR para el MGMT: 0.480 (0.231-0.999). Los pacientes con MGMT tienen 2.083 veces menos riesgo de éxitus.

	B	ET	Wald	Gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
Edad 50	,915	,367	6,238	1	,013	2,498	1,218	5,123
Metilacion MGMT	-,734	,374	3,857	1	,050	,480	,231	,9

Tabla 13: Análisis multivariable de supervivencia global.

El mismo análisis se realizó a cabo con las variables relacionadas con la supervivencia libre de progresión. La variable que quedó en el modelo relacionadas con la progresión fue (Tabla 14):

- La metilación MGMT: OR para el MGMT: 0.351 (0.162-0.758). Los pacientes con MGMT metilado tienen 2.85 veces menos riesgo de progresión de la enfermedad.

	B	ET	Wald	g l	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
Metilacion MGMT	-1,047	,393	7,101	1	,008	,351	,162	,758

Tabla 14: Análisis multivariable de supervivencia libre de progresión.

6. SUBGRUPOS PRONÓSTICOS

Para analizar la posible relación entre MGMT y CD133 creamos diferentes subgrupos de pacientes en función de la expresión de ambas variables con el fin de detectar diferentes grupos pronósticos.

Metilación de MGMT y expresión de CD133.

Primero analizamos metilación de MGMT y niveles de CD133 por inmunohistoquímica y su relación con supervivencia global en todos los pacientes (Figura 44). Los pacientes con mejor pronóstico fueron aquellos metilados con altos niveles de CD133 (20 meses) y los de peor pronóstico los no metilados con altos niveles de CD133 (10 meses). Aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística si estuvieron cerca de hacerlo.

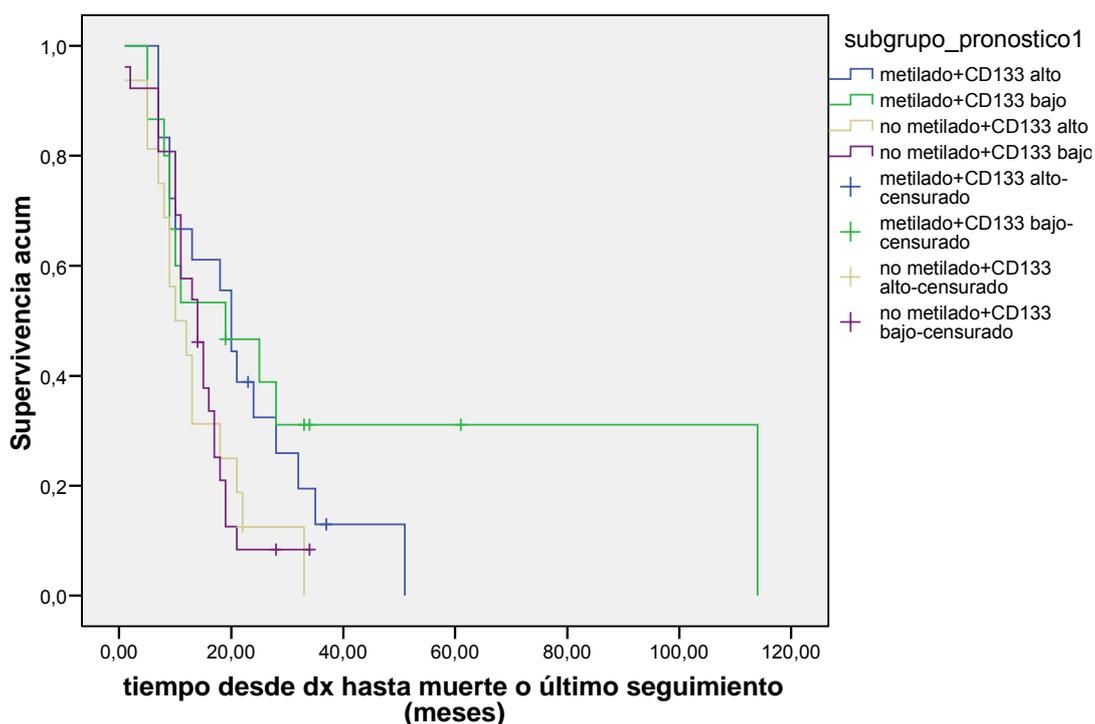


Figura 44: Curvas de supervivencia global (Kaplan-Meier) según la combinación del estado de metilación de MGMT y los niveles de CD133 por inmunohistoquímica en el global de los pacientes. * $p=0,074$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Después analizamos el valor de esta posible clasificación pronóstica sólo en el subgrupo de pacientes del Hospital Virgen de las Nieves de Granada. En el análisis de supervivencia global los pacientes con mejor pronóstico fueron aquellos metilados con altos niveles de CD133 (24 meses) frente al resto de los subgrupos, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística si estuvieron cerca de hacerlo (Figura 45). En el análisis de supervivencia libre de progresión los pacientes con mejor pronóstico fueron aquellos metilados con altos niveles de CD133 (SLP 10 meses) frente al resto de los subgrupos, estas diferencias sí alcanzaron la significación estadística (Figura 46).

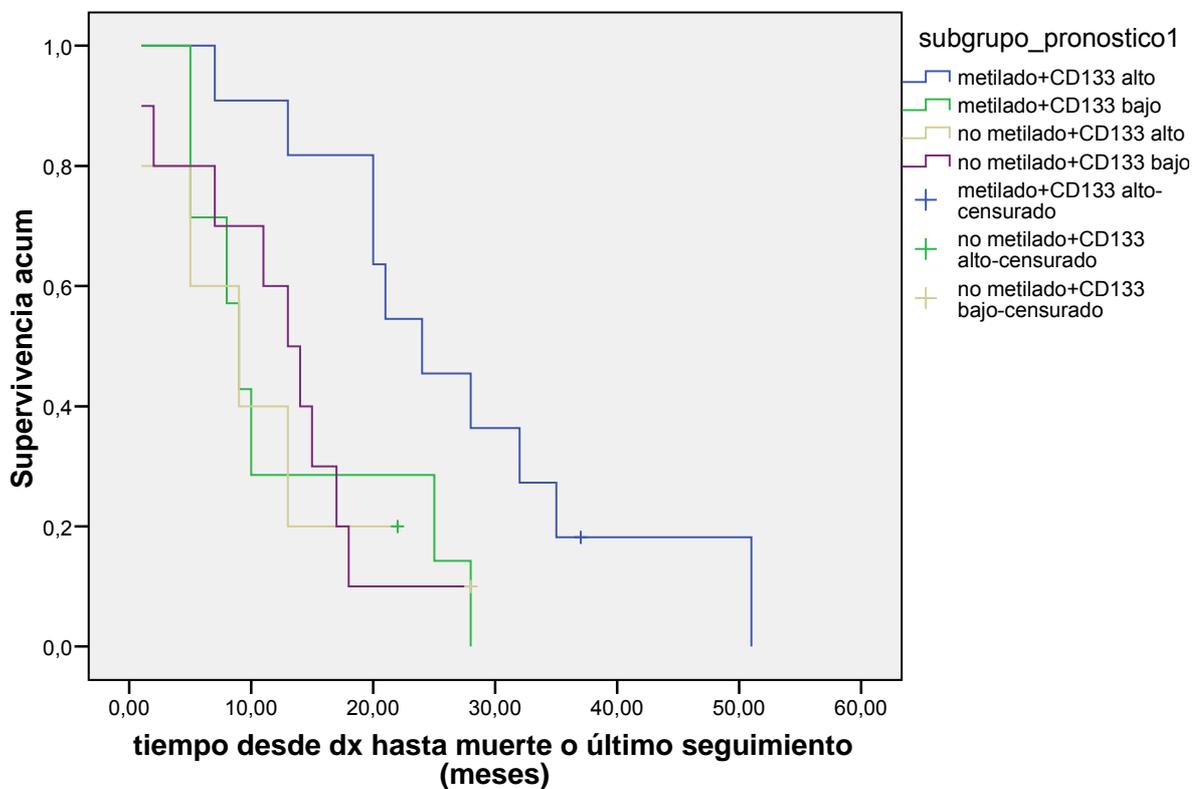


Figura 45: Curvas de supervivencia global (Kaplan-Meier) según la combinación del estado de metilación de MGMT y los niveles de CD133 por inmunohistoquímica pacientes HUVN. * $p=0,057$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

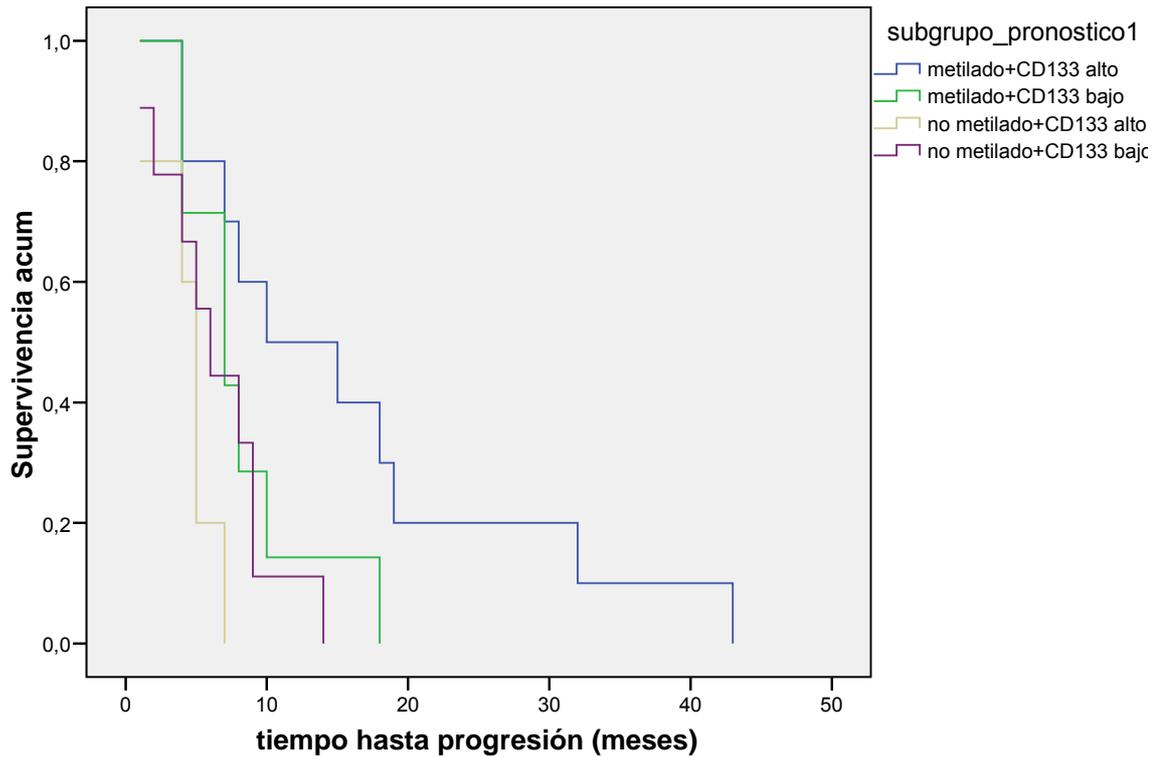


Figura 46: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según la combinación del estado de metilación de MGMT y los niveles de CD133 por inmunohistoquímica pacientes HUVN. * $p=0,008$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Expresión de MGMT y expresión de CD133.

Analizamos niveles de proteína MGMT y niveles de CD133 por inmunohistoquímica y su relación con supervivencia global en todos los pacientes, con el fin de establecer subgrupos pronósticos basándonos en dos determinaciones inmuno histoquímicas que son realizables en cualquier laboratorio.

No hubo diferencias en el global de los pacientes entre los distintos subgrupos en el análisis de supervivencia global (Figura 47).

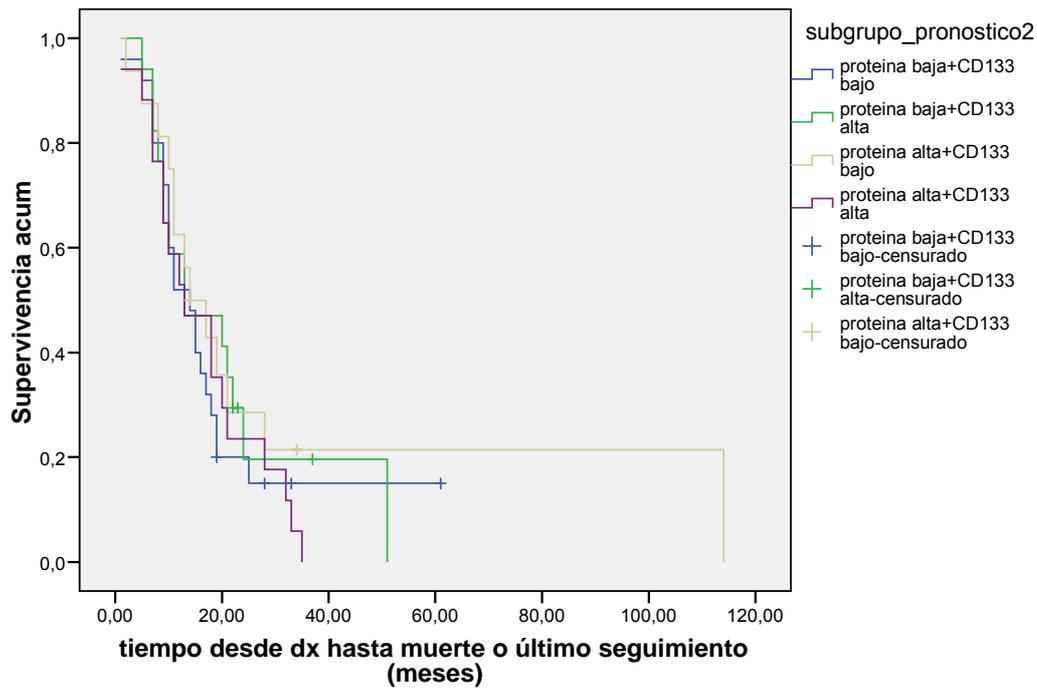


Figura 47: Curvas de supervivencia global (Kaplan-Meier) según la combinación de niveles de proteína MGMT y los niveles de CD133 por inmunohistoquímica en el global de los pacientes. * $p=0,705$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Después analizamos el valor de esta posible clasificación pronostica en el subgrupo de pacientes del Hospital Virgen de las Nieves. La mediana de supervivencia global fue superior en el grupo de pacientes con bajos niveles de proteína MGMT y altos niveles de CD133 (21 meses), frente al resto (13-14 meses), sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 48). La mediana de supervivencia libre de progresión fue similar en todos los subgrupos de pacientes (Figura 49).

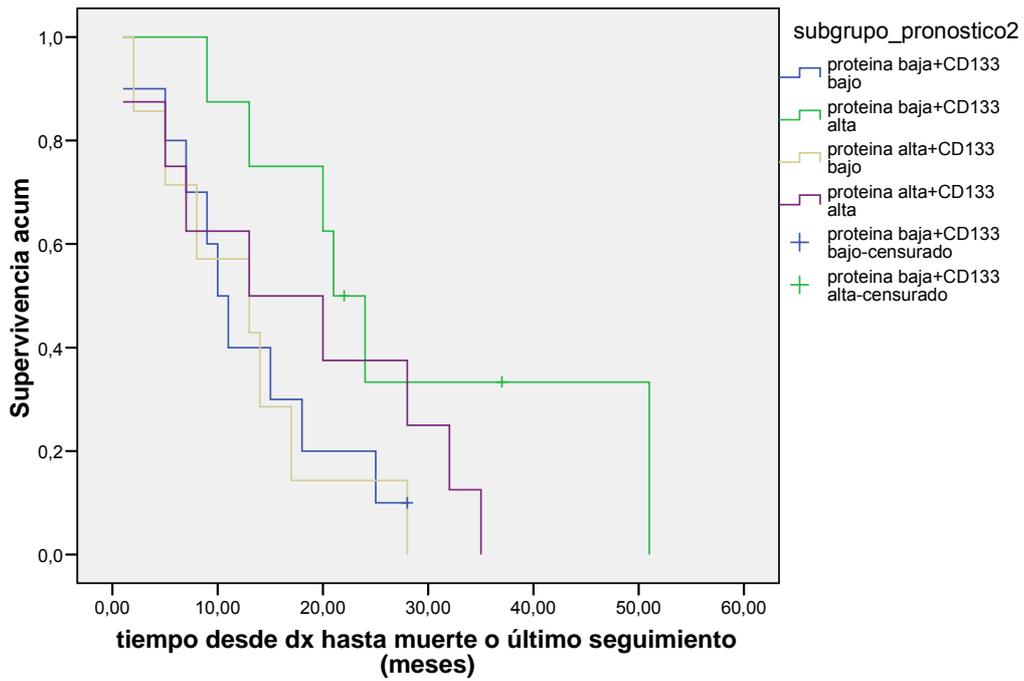


Figura 48: Curvas de supervivencia global (Kaplan-Meier) según la combinación de niveles de proteína MGMT y los niveles de CD133 por inmunohistoquímica pacientes HUVN. * $p=0,130$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

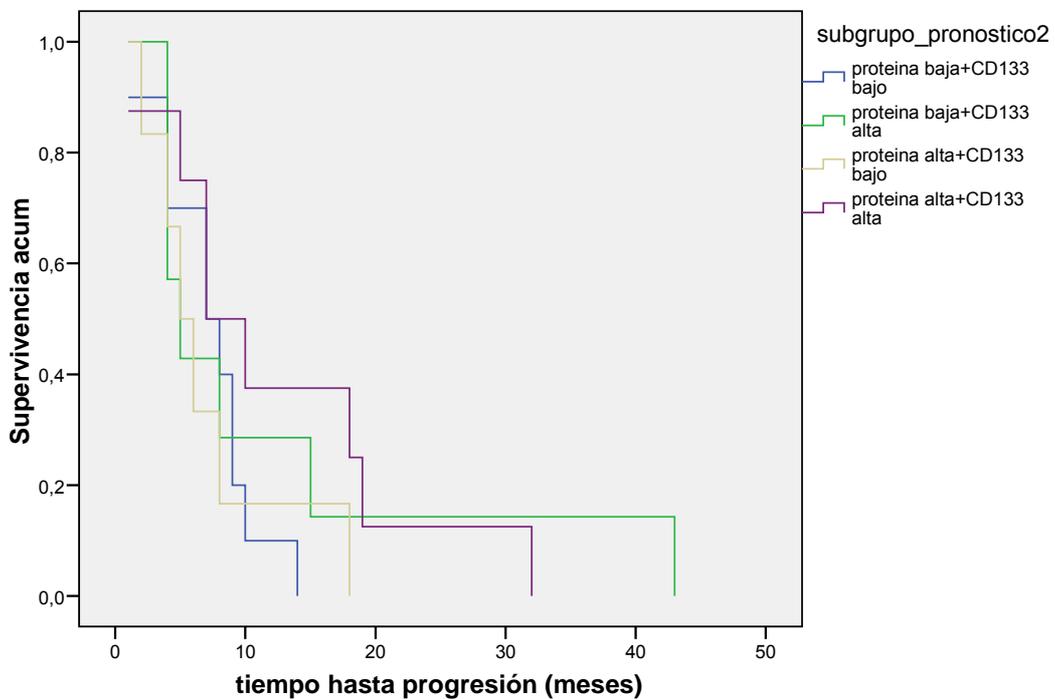


Figura 49: Curvas de supervivencia libre de progresión (Kaplan-Meier) según la combinación de niveles de proteína MGMT y los niveles de CD133 por inmunohistoquímica pacientes HUVN. * $p=0,521$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

7. ANÁLISIS BIVARIANTE DE RESPUESTA

7.1 Variables relacionadas con la respuesta radiológica en el global de los pacientes.

El estado de metilación de MGMT fue un factor predictivo de respuesta radiológica al tratamiento con RT y TMZ (Tabla 15). El resto de las variables analizadas no alcanzó la significación estadística.

			respuesta radiológica recodificada		Total
			No	Si	
MGMT	no	Recuento	33	7	40
		% de MGMT	82,5%	17,5%	100,0%
	si	Recuento	17	13	30
		% de MGMT	56,7%	43,3%	100,0%
Total		Recuento	50	20	70
		% de MGMT	71,4%	28,6%	100,0%

Tabla 15: Test de Fisher para el estado de metilación de MGMT en el global de los pacientes ($p=0.036$)

7.2 Variables relacionadas con la respuesta clínica grupo HUVN.

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la respuesta clínica y el sexo, la localización tumoral, el tiempo de evolución de la clínica, el tipo de cirugía realizada, los implantes de carmustina ni el número de ciclos de temozolamida adyuvante.

Aunque no es significativo con un nivel de 0.05, si ampliamos el nivel de confianza, podemos decir que los pacientes con mayor número de ciclos tuvieron mejor respuesta clínica (Test de Mann-Whitney, $p=0.071$, Tablas 16 y 17).

	respuesta clínica recodificada	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Edad	No	18	55,78	11,860	2,795
	Si	20	49,80	13,037	2,915
Nº ciclos	No	16	5,94	6,648	1,662
	Si	19	7,11	4,122	,946

	Edad	nº ciclos
U de Mann-Whitney	141,000	97,500
W de Wilcoxon	351,000	233,500
Z	-1,142	-1,824
Sig. asintót. (bilateral)	,253	,068
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,264(a)	P=0.071

Tablas 16 y 17: Test de Mann-Whitney para las variables edad y nº de ciclos (p=0.071).

Uno de los objetivos principales del estudio era determinar el valor de la metilación de MGMT como factor predictivo de respuesta al tratamiento. No se observó una relación estadísticamente significativa entre la metilación de MGMT y el tipo de respuesta clínica al tratamiento. De los 18 pacientes que presentaron progresión tumoral a pesar del tratamiento quimiorradioterápico, 10 tenían el promotor MGMT metilado, 7 no metilado y en 1 no se pudo realizar por falta de muestra. En relación a los 3 pacientes que se evaluaron como estabilización de la enfermedad, 2 tenían MGMT metilado y 1 no. En cuanto a los 6 pacientes que obtuvieron respuesta parcial, 4 estaban metilados y 2 no. De los 11 pacientes que consiguieron una respuesta completa, 7 presentaban MGMT metilado, 3 no metilado y en 1 no se pudo realizar. Aunque no hay significación estadística parece haber una mayor proporción de pacientes metilados entre aquellos que consiguen una respuesta completa o parcial clínica (Figura 50).

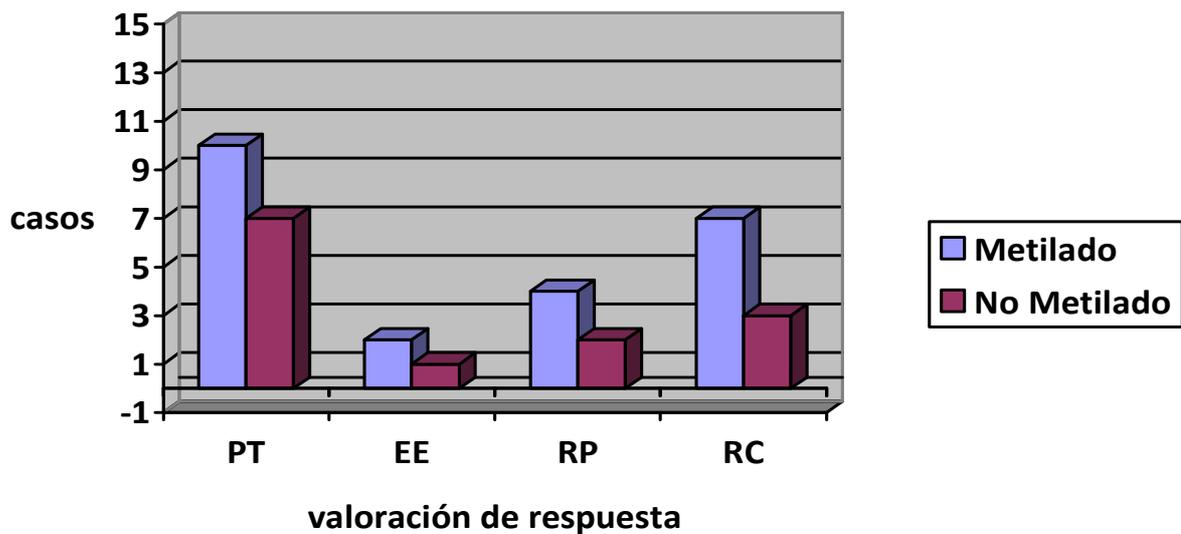


Figura 50: Metilación de MGMT en relación a la respuesta clínica al tratamiento.

7.3 Variables relacionadas con la respuesta radiológica grupo HUVN

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la respuesta radiológica y el sexo, la localización tumoral, el tiempo de evolución de la clínica, el tipo de cirugía realizada, Ki 67 (aunque la tasa de respuestas es el doble en los pacientes con Ki 67 < 14%, 50% vs. 26%, no alcanza la significación estadística, $p=0.339$), ni p53 (aunque la tasa de respuestas es el doble en los pacientes con p53 < 5%, 44% vs. 22%, no alcanza la significación estadística, $p=0.237$).

Sí hubo diferencias significativas en el número de ciclos de temozolamida recibidos, aquellos pacientes que recibieron un mayor número de ciclos obtuvieron una mayor tasa de respuestas (Tablas 18 y 19).

	Respuesta radiológica recodificada	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Edad	No	21	53,76	8,905	1,943
	Si	14	51,21	15,837	4,232
Nº ciclos	No	20	5,60	6,056	1,354
	Si	13	8,85	3,484	,966

	Edad	nº ciclos
U de Mann-Whitney	127,000	47,000
W de Wilcoxon	232,000	257,000
Z	-,675	-3,096
Sig. asintót. (bilateral)	,500	,002
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,516(a)	P=0,002

Tablas 18 y 19: Test de Mann-Whitney para las variables edad y nº de ciclos ($p=0.002$).

También se observaron diferencias significativas en relación a los implantes de carmustina mediante el test de Fisher, $P=0.005$. Los pacientes que los recibieron, no obtuvieron respuesta radiológica y todos progresaron. De los que no lo recibieron el 46,2% no obtuvo respuesta y el 53,8% si la obtuvo (Tabla 20).

		Respuesta radiológica recodificada		Total	
		No	Si		
Gliadel	no	Recuento	12	14	26
		% de gliadel	46,2%	53,8%	100,0%
	Si	Recuento	9	0	9
		% de gliadel	100,0%	,0%	100,0%
Total	Recuento	21	14	35	
	% de gliadel	60,0%	40,0%	100,0%	

Tabla 20: Test de Fisher para los implantes de carmustina ($p=0.005$).

Uno de los objetivos principales del estudio era determinar el valor de la metilación de MGMT como factor predictivo de respuesta al tratamiento. No se observó una relación estadísticamente significativa entre la metilación de MGMT y el tipo de respuesta radiológica al tratamiento. De los 21 pacientes que presentaron progresión tumoral a pesar del tratamiento quimiorradioterápico, 12 tenían el promotor MGMT metilado, 8 no metilado y en 1 no se pudo realizar por falta de muestra. En relación a los 4 pacientes que se evaluaron como estabilización de la enfermedad, 3 tenían MGMT metilado y 1 no. En cuanto a los 6 pacientes que obtuvieron respuesta parcial, 3 estaban metilados, 2 no metilado y en 1 no se pudo realizar por falta de muestra. De los 4 pacientes que consiguieron una respuesta completa, 3 presentaban MGMT metilado y 1 no metilado. Aunque no hay significación estadística parece haber una mayor proporción de pacientes metilados entre aquellos que consiguen una respuesta completa radiológica (Figura 51).

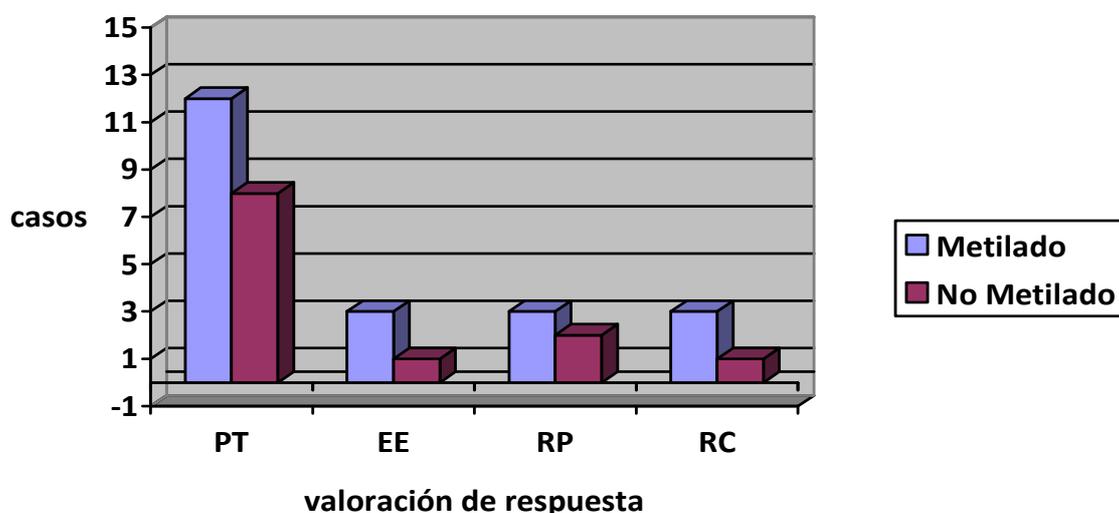


Figura 51: Metilación de MGMT en relación a la respuesta radiológica al tratamiento.

Tampoco se observaron diferencias significativas en relación con la respuesta radiológica y los niveles de expresión de proteína MGMT, ni la expresión de CD133 por inmunohistoquímica o porcentaje de inmunoreactividad nuclear.

8. PACIENTES REINTERVENIDOS

Se desconoce las variaciones que pueden sufrir la metilación del promotor de MGMT, la expresión de la proteína MGMT y la expresión de CD133 tras el tratamiento; y cual podría ser su impacto pronóstico. Analizamos 10 pacientes que habían sido reintervenidos por progresión de la enfermedad tras el tratamiento con radioterapia y temozolamida, de los cuales disponíamos de muestra de la primera y la segunda cirugía para el análisis (Tabla 21).

No hubo diferencias significativas al comparar las variables pre y post tratamiento con radioterapia y temozolamida (test de Mc Nemar).

Pac.	<u>Muestra pre-tratamiento</u>				<u>Muestra post-tratamiento</u>			
	Metilac MGMT	Proteína MGMT	Expres CD133	Porcent CD133	Metilac MGMT	Proteína MGMT	Expres CD133	Porcent CD133
1	Met	+	++	5-25%	Met	+/-	+	25-75%
2	Met	++	+	5-25%	No Met	++	-	-
3	No Met	+++	+	< 5%	No Met	+	++	25-75%
4	Met	++	+	5-25%	Met	++	+	5-25%
5	Met	+	++	< 5%	No Met	+	+	< 5%
6	No Met	+	+	25-75%	Met	+	+	5-25%
7	No Met	+	+	25-75%	No Met	+	+++	5-25%
8	Met	+	++	25-75%	No Met	+	++	25-75%
9	No Met	+/-	+	< 5%	-	-	-	-
10	No Met	+/-	+	< 5%	No Met	++	++	25-75%
11	Met	++	+	> 75%	Met	+++	+	25-75%

Tabla 21: Pacientes reintervenidos, modificación tras tratamiento.

Discusión

El glioblastoma multiforme (GBM) representa el glioma más agresivo en la población adulta. A pesar de los resultados de las investigaciones más recientes, el pronóstico de estos tumores permanece sombrío. Los avances en el diagnóstico por imagen han permitido definir mejor las características del tumor y de las estructuras circundantes, y por tanto mejorar las resecciones quirúrgicas. Estas técnicas hacen que el oncólogo radioterápico posea una mayor precisión en la administración de la irradiación, disminuyendo la lesión del tejido aparentemente sano. La evolución de las técnicas quirúrgicas, tales como el control intraoperatorio de la función del sistema nervioso, han ayudado a completar la exéresis del tumor con una menor morbilidad y, en la actualidad, el conocimiento de las células madre del cerebro ofrece nuevas expectativas para futuros tratamientos. No obstante, y aunque el objetivo principal sea mejorar la mediana de supervivencia global con una buena calidad de vida, la realidad es que aún no disponemos de recursos terapéuticos suficientes que nos ayuden a modificar de forma significativa su evolución.

Deberemos destacar, dentro del estudio de esta patología, dos hallazgos importantes.

El primero fue el descubrimiento de alteraciones en los genes que codifican proteínas implicadas en la reparación del ADN. Una de estas proteínas es la enzima metil-guanina-O6-DNA metiltransferasa (MGMT). Esta enzima repara el ADN a través de la eliminación directa de un grupo alquilo del átomo O⁶ de la guanina de las células expuestas a agentes alquilantes. Para ello actúa transfiriendo estos radicales a una cisterna interna en una reacción que inactiva de forma irreversible a una molécula de *MGMT* por cada lesión reparada (enzima suicida). La metilación del promotor del gen que codifica dicha enzima lleva al silenciamiento epigenético de su expresión y por tanto a que no se produzca la proteína reparadora; en este escenario, la lesión producida por la quimioterapia en la célula tumoral se convierte en irreversible y la célula entra en apoptosis. La efectividad del tratamiento con agentes alquilantes es pues mejor si no hay proteína lo que acontece si el promotor del gen *MGMT* se encuentra metilado (Hegi y cols., 2005).

El segundo es que son tumores que derivan de una célula madre troncal pluripotencial con características fenotípicas y genotípicas de célula madre (*Cancer Stem Cell, CSC*), lo que le confiere una elevada resistencia a los

tratamientos. Las células madre formadoras de gliomas (*Glioma Stem Cell, GCS*) suponen una pequeña fracción del total de las células que componen el tumor (Shing y cols., 2003). Las GSC se caracterizan por poseer una proteína de superficie denominada CD133 (o Prominina 1) de 130 kD con cinco dominios transmembrana, encontrada comúnmente en células madres o progenitoras de varios tejidos, incluyendo las células madre neuronales, y en células madre de tumores gliales y de otras neoplasias. Shing y cols (2004) demostraron que la expresión del marcador de células madre neuronales CD133 en células tumorales era a la vez necesario y suficiente para iniciar y reproducir el tumor. El aislamiento de las células madres cancerosas del SNC (CD133 positivas) y su trasplante (unas 100 células) a cerebros de ratones inmuno deprimidos permitía la obtención de gliomas. Sin embargo esto no sucedía si se transplantaban células CD133 negativas, a pesar de que el número de células implantadas fuese un millón. Aunque esto ha sido recientemente disputado por Beier y cols (2007), describiendo GBM que no contienen células tumorales CD133 positivas pero en los que se han identificado GSC CD133 negativas que se asemejan a ellas en términos de diferenciación y tumorigenicidad. En este contexto, se especula sobre la posibilidad de que CD133 pueda ser un marcador molecular, entre otros, que nos ayude a saber con más exactitud el pronóstico de estos pacientes y seleccionar su tratamiento óptimo. La relevancia clínica de estos marcadores está siendo objeto de una intensa investigación en estos últimos años.

Recientemente se han publicado los datos procedentes de The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network, que divide al glioblastoma multiforme en subtipos moleculares que muestran distintas respuestas a la quimioterapia y a la radioterapia, con una diferencia de alrededor del 50% entre los subtipos. Los nuevos hallazgos, publicados recientemente en la revista *Cancer Cell* (Verhaak y cols., 2011), podrían conducir a enfoques terapéuticos más personalizados. Cada subtipo podría iniciarse desde diferentes tipos de células y estas diferencias podrían explicar la variación en la respuesta al tratamiento. El trabajo se basó en muestras de 260 pacientes y datos de las secuencias de 601 genes. Estos perfiles genómicos han permitido la clasificación de los glioblastomas multiformes en 4 subtipos, basándose principalmente en las alteraciones y expresión de EGFR, NF-1, PDGFRA y

IDH1: proneural, neural, clásico y mesenquimal. Se encontró beneficio en el tratamiento con quimio-radioterapia concurrente en el subtipo clásico y mesenquimal, se sugería el efecto en el neural y no alteró la supervivencia en el proneural. También se confirmó el efecto que sobre la supervivencia poseía la metilación de MGMT y que dicha metilación no tenía relación con el subtipo. El TCGA ha identificado también conexiones entre características como la edad del paciente y el subtipo molecular. Así el subtipo proneuronal se asocia con pacientes más jóvenes, mutaciones en los genes IDH1 y TP53, y resistencia a la quimioterapia y a la radiación. Por otra parte, el subtipo clásico, se encuentra relacionado con anomalías en el gen EGFR y sensibilidad al tratamiento.

En este contexto surge el presente **Proyecto de Investigación** que pretende confirmar el valor de marcadores pronósticos establecidos en nuestro propio grupo de pacientes y avanzar en la determinación de nuevos marcadores pronósticos o predictivos de respuesta al tratamiento de los glioblastomas multiformes.

Determinación de la Metilación del promotor del gen de MGMT: MSP.

La PCR específica de metilación (MSP) es la técnica de referencia, estándar de oro y única técnica validada por el momento para determinar el estatus de MGMT. Es una técnica compleja que depende de la calidad y la cantidad del ADN de la muestra, de la especificidad de los cebadores, de la reacción de modificación con el bisulfito y de las condiciones de la PCR. Los estudios que aportan información sobre el valor pronóstico de metilación de MGMT en los que se ha aplicado MSP provienen de series heterogéneas, con histologías y metodologías variables, por lo que resulta difícil comparar los resultados (Tabla 1).

Autor/año	N	Histología	Método	Impacto en supervivencia		Factor pronostico indep en AM
				SG	SLP	
Esteller y cols. 2000	47	29 GBM 18 AA	MSP	SI	SI	NO
Paz y cols. 2004	92	51 GBM 41 G III	MSP	NO ¹	NO	--
Hegi y cols. 2004	38	GBM	MSP	SI	--	SI
Watanabe y cols. 2005	45	29 GBM 16 AA	MSP	SI ²	SI ²	SI
Hegi y cols. 2005	206	GBM	MSP	SI	SI	SI
Brandes y cols. 2006	54	AOA OA	MSP	NO	NO	NO
Wick y cols. 2007	36	GBM	MSP	NO	NO	--
Criniere y cols. 2007	219	GBM	MSP	SI	NO	SI
Brandes y cols. 2008	103	GBM	MSP	SI	SI	SI
Sadones y cols. 2009	38	22 GBM 16 G III	MSP cuantitativa	SI ³	SI ³	SI ³
Van den Bent 2009	152	OA	MS-MLPA ⁴	SI	SI	SI
Metellus y cols. 2009	22	GBM	MSP	SI	SI	SI
Weller y cols. 2009	301	GBM	MSP	SI	SI	SI
Wick y cols. 2009	318	Gliomas grado 3	MSP	--	SI	SI
Brandes y cols. 2009	58	GBM	MSP	--	SI	--
Dunn y cols. 2009	109	GBM	Pirosecu- Ciación	SI	SI	SI
Brandes y cols. 2009	37	GBM	MSP	SI	SI	SI

Brandes y cols. 2010	38	GBM	Nested MSP	SI ⁵	--	--
Rivera y cols. 2010	225	GBM	RT-PCR Cuantitativa	SI	SI	SI

¹ Tendencia a la significación estadística en los GBM con metilación del promotor.

² Diferencias significativas sólo para GBM.

³ Diferencias significativas sólo en AA.

⁴ Methylation specific-multiplex ligation-dependent probe amplification.

⁵ Sólo factor pronóstico en 1ª cirugía, o en reintervención.

Tabla 1: Principales estudios que evalúan el papel pronóstico de metilación de MGMT.

Los principales problemas para su implementación en la práctica clínica diaria según algunos autores (Sadones y cols., 2009) son:

- No se obtendrán resultados concluyentes en un tercio de los bloques de parafina por material insuficiente, necrosis extensa o haber sido fijados en malas condiciones para mantener la calidad del ADN. Esta limitación es quizás de las más importantes ya que en la mayoría de los centros se almacenan las muestras en parafina, no congeladas. En el estudio de Hegi sólo se dispuso de material suficiente para realizar el test en la mitad de los casos y de ellos sólo en el 67% se obtuvo un resultado concluyente (Hegi y cols, 2005), esto supone un 37% de resultados válidos sobre el total de los casos. Además en las series hay una escasa o nula representación de pacientes biopsiados (por la escasez de la muestra), lo que puede influir de forma significativa en el análisis de la supervivencia.
- Para el análisis de metilación se emplean homogenizados de tejido tumoral, lo que puede facilitar la contaminación con células no tumorales.
- El tratamiento con bisulfito degrada el ADN, lo que puede dar lugar a falsos negativos.
- La MSP hace una valoración cualitativa de la muestra, no pudiendo diferenciar aquellos tumores que a pesar de estar metilados sus niveles de metilación están por debajo del silenciamiento transcripcional del gen. Cuando se realiza la determinación de la metilación mediante cuantificación se observa que existe un subgrupo de pacientes con metilación intermedia (zona gris) (Weller y cols., 2010). Pero las técnicas

de cuantificación de metilación no han sido validadas y estandarizadas, estamos a la espera de los resultados del estudio prospectivo RTOG 0525 que espera validar esta técnica, hasta el momento sólo han presentado sus resultados en forma de abstract en el 2011 ASCO (American Society of Clinical Oncology) Annual Meeting, dichos resultados han sido positivos.

Nosotros hemos realizamos un estudio retrospectivo de estado de metilación de MGMT en 78 pacientes diagnosticados de glioma de alto grado (GBM) mediante MSP, siendo nuestro primer objetivo estandarizar la técnica de determinación de la metilación. Para ello se han realizado múltiples protocolos de extracción del ADN de las muestras incluidas en parafina hasta encontrar el protocolo que permitió obtener los mejores resultados en cuanto a ratio y concentración. Nuestro resultado final ha sido que la condiciones ideales de procesamiento surgen de la combinación de los sistemas utilizados por diferentes autores (Chan y cols., 2001; Jiménez y cols., 2007 y Coura y cols., 2005). Este protocolo fue aplicado a todas las muestras.

Metilación del promotor del gen de MGMT: factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento con radioterapia y temozolamida.

Los numerosos estudios realizados parecen confirmar que la metilación del promotor de MGMT es un importante marcador molecular en pacientes con gliomas. Dicha metilación es un marcador predictivo de respuesta a temozolamida en estos pacientes y es probable que sea indicativo de un fenotipo molecular específico con un amplio significado pronóstico. Estudios que correlacionan éste con otros marcadores pronóstico, tales como 1p19q o las mutaciones en IDH1 e IDH2, deben aclarar aún más su importancia en esta población de pacientes. Estamos a la espera de futuros ensayos de fase III, como el estudio RTOG 0525 (Figura 1), aunque se prevé que en pacientes con glioma debe considerarse la evaluación del estado de metilación del promotor MGMT como un parámetro de estratificación.

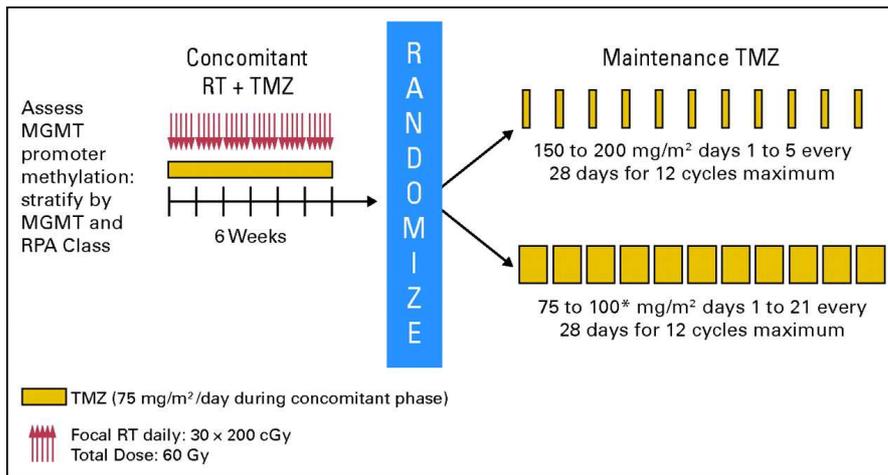


Figura 1: Esquema del estudio RTOG 0525 en el que se estratifican los pacientes en función del estado de metilación de MGMT.

Entre los estudios más importantes (Tabla 1) que encuentran que la metilación del promotor del gen de MGMT es un factor pronóstico en gliomas malignos se encuentran los de Hegi y cols. (2005), Brandes y cols. (2008), Brandes y cols. (2009), Dunn y cols. (2009) y Rivera y cols. (2010). Además, la determinación de dicha metilación como factor predictivo de respuesta a quimioterapia basada en agentes alquilantes añadidos a la radioterapia ha sido realizada por Esteller y cols. (2000), Tanaka y cols. (2003), Paz y cols. (2004) y Hegi y cols. (2005). De ellos se deduce que el estado de metilación del promotor de MGMT puede servir para seleccionar a los pacientes que más se van a beneficiar de la adición de temozolamida a la radioterapia, al ser un factor predictivo de respuesta. Para los pacientes no metilados se debería ofertar la inclusión en ensayos clínicos con tratamientos con diferente mecanismo de acción o métodos de inhibición de MGMT. Sin embargo, hasta el momento, no podemos recomendar el uso rutinario de la metilación de MGMT para decidir quién va a recibir temozolamida y quién no, puesto que aún no disponemos de un tratamiento alternativo eficaz.

Nos vamos a centrar en aquellos estudios que han evaluado el papel pronóstico del estado de metilación de MGMT en un subgrupo homogéneo de pacientes, incluyendo sólo GBM. El primer estudio fue el análisis que realizaron Hegi y cols (2005) en 206 pacientes pertenecientes al estudio EORTC 26981. Encontraron un porcentaje de metilación del 45%, y mostró ser un factor

pronóstico independiente y predictivo de respuesta a la adición de temozolamida a la radioterapia. Otra gran serie retrospectiva fue la de Criniere y cols (2007) en el que 219 GBM tratados con varias modalidades de agentes alquilantes fueron analizados. El estado de metilación no tuvo impacto en el global del grupo, pero sí en aquellos que fueron tratados con quimiorradioterapia, con beneficio en SG. También Brandes y cols (2008) en su estudio prospectivo para evaluar el impacto de la metilación de MGMT sobre la incidencia de pseudo progresión y el resultado, mostraron que en 109 GBM tratados con el régimen de Stupp la metilación del promotor era un factor pronóstico independiente de SG y SLP. Este mismo grupo publicó un año después (Brandes y cols., 2009) otro estudio realizado en pacientes ancianos tratados con el régimen estándar, en ellos el estado de metilación también era factor pronóstico significativo. Otro gran estudio prospectivo fue el realizado por el grupo alemán (Weller y cols., 2009) en 301 pacientes con GBM tratados de diversa manera (RT exclusiva, QT exclusiva y RT/QT). En él, el estado de metilación fue factor pronóstico significativo de SG y SLP sólo en el subgrupo de pacientes tratados con RT-Temozolamida. Sin embargo en otra gran serie reciente (Rivera y cols., 2010) de 225 GBM tratados con RT exclusiva, la metilación del promotor de MGMT también fue factor pronóstico de supervivencia.

Hay otros tres estudios realizados en pacientes con GBM en recaída. El primero es el de Wick y cols (2007), que evalúan la eficacia del esquema semanal de administración de temozolamida en 90 pacientes con GBM recurrente, el estado de metilación no fue factor pronóstico. Posteriormente Metellus y cols (2009) analizaron el papel de la metilación en 22 GBM recurrentes tratados con reintervención e implantes de carmustina, en estos pacientes fue factor pronóstico el estado de metilación en la primera cirugía, pero no en la segunda. Algo similar mostró el grupo de Brandes (Brandes y cols., 2010) en 44 GBM reintervenidos, analizaron el estado de metilación en ambas cirugías y mostraron que sólo fue factor pronóstico de supervivencia el determinado en la primera cirugía.

En nuestro estudio, al analizar el *global de los pacientes con glioblastoma multiforme* (78 pacientes), el *estado de metilación de MGMT* resultó ser un *factor pronóstico de supervivencia global* (19 meses en metilados frente a 13 meses en no metilados, $p=0.031$), siendo ésta la única supervivencia que se pudo analizar al no disponer de los datos de fecha de progresión en un subgrupo de los pacientes. El porcentaje de metilación fue de 43,6%, el 53,8% no estaba metilado, y en un pequeño porcentaje (2,6%) no se pudo realizar la determinación por no poder extraer el ADN.

Después procedimos a analizar los pacientes por subgrupos en función del lugar de tratamiento. Entre los pacientes del Hospital Virgen de las Nieves de Granada; veinticuatro pacientes presentaban metilación del promotor de MGMT (55,8%), diecisiete no estaban metilados (39,5%) y en dos pacientes no se pudo extraer DNA (4,7%). Encontramos un porcentaje de metilación de MGMT algo superior a lo reportado por Hegi y cols. (2005), pero similar al de otros autores (Crineire y cols. 2007, Dunn y cols. 2009). Analizamos el impacto pronóstico de la metilación de MGMT en este subgrupo; el estado de metilación resultó ser *factor pronóstico de SLP* (8 meses en metilados frente a 6 meses en no metilados, $p=0.036$) y *de SG* (21 meses frente a 13, $p=0.043$). La metilación de MGMT se confirmó como factor pronóstico independiente de supervivencia global y libre de progresión en el análisis multivariable.

Sin embargo en el subgrupo de pacientes del Hospital Sassary de Italia el análisis de metilación de MGMT no tuvo impacto pronóstico, una posible explicación puede ser el menor seguimiento de estos pacientes o diferencias entre los centros en el empleo de segundas líneas de tratamiento, reintervenciones, radio cirugías o incluso en la evaluación de la respuesta radiológica, ya que el no tener en cuenta la alta probabilidad de pseudo-progresiones en los primeros meses del tratamiento puede llevar a considerar ineficaz precozmente un tratamiento que en realidad sí lo es.

También analizamos si la metilación de MGMT era un factor predictivo de respuesta al tratamiento con temozolamida. Para ello se tuvieron en cuenta todos los pacientes (78). Al analizar todos los pacientes con GBM el estado de metilación de MGMT resultó ser factor predictivo de respuesta radiológica al tratamiento con temozolamida y radioterapia. Los pacientes metilados tenían mayor tasa de respuesta frente a los no metilado (43,3% vs. 17,5%, $p=0.036$

test de Fisher). No es posible distinguir si es predictivo de respuesta a temozolamida, a radioterapia o a ambos, pues se tratan de pacientes tratados con el protocolo estándar de Stupp (RT/TMZ concurrente + TMZ adyuvante).

Después analizamos los pacientes pertenecientes al Hospital Virgen de las Nieves. 21 pacientes (60%) se evaluaron como progresión tumoral radiológica (PT), 4 pacientes (11,4%) presentaron estabilización tumoral (EE), 6 pacientes (17,1%) obtuvieron una respuesta parcial (RP) y 4 pacientes (11,4%) consiguieron una respuesta completa (RC), 3 pacientes no se reevaluaron radiológicamente (considerados perdidos por el sistema). No se observó una relación estadísticamente significativa entre la metilación de MGMT y el tipo de respuesta radiológica al tratamiento. Parece observarse una mayor proporción de pacientes metilados entre aquellos que consiguen una respuesta completa radiológica, aunque sin significación estadística. En el subgrupo de pacientes del Hospital Virgen de las Nieves de Granada la metilación de MGMT no fue factor predictivo de respuesta al tratamiento con temozolamida.

En el subgrupo de pacientes pertenecientes a nuestro hospital la determinación de la metilación de MGMT también tiene valor pronóstico en los pacientes con glioblastoma multiforme, con medianas de SG y de SLP similares a las observadas en el estudio EORTC/NCIC. El análisis del global de los pacientes parece indicar que si en nuestro medio aumentásemos el tamaño muestral también sería un factor predictivo de respuesta al tratamiento con temozolamida y radioterapia.

Expresión de la proteína MGMT por inmunohistoquímica (IHQ): factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento con temozolamida.

El descenso de los niveles de proteína MGMT se puede atribuir al silenciamiento epigenético producido por la metilación del promotor del gen de MGMT. En base a la dificultad técnica que supone la implantación en los Centros de la tecnología de MSP, se ha intentado determinar la expresión proteica de MGMT por inmunohistoquímica y a partir de los resultados obtenidos establecer las diferentes correlaciones pronosticas. No obstante, el valor clínico de esta detección es controvertido por varias razones: I) en primer

lugar, ha fallado en diversas ocasiones al intentar relacionarlo con el pronóstico en los estudios que incluían un mayor número de pacientes (Rodríguez y cols. 2008, Preusser y cols. 2008); II) en segundo lugar, la alta variabilidad ínter observador que cuestiona la reproducibilidad de este método (Preusser y cols. 2008); III) en tercer lugar, muchos autores no han logrado identificar una correlación entre la metilación de MGMT por MSP y la expresión de la proteína por IHQ (Preusser y cols. 2008, Rodríguez y cols. 2008); IV) y en cuarto lugar, los puntos de corte publicados para definir niveles altos y bajos de expresión de MGMT son muy variables.

Los principales motivos de controversia para el empleo de las técnicas de IHQs son los siguientes: I) La contaminación con células no neoplásicas que expresan MGMT (glia, células endoteliales, linfocitos,...) (Rodríguez y cols., 2008). Aunque a diferencia de la MSP al no realizarse sobre un homogeneizado de tejido se puede analizar la expresión de proteína en cada célula individual y valorar si la expresión proteica es o no tumoral (Nakasu y cols., 2004). II) El punto de corte usado para considerar el tumor inmunopositivo. III) Menor sensibilidad en comparación con otras técnicas. IV) La variabilidad ínter observador.

Hay diversos estudios que analizan el impacto pronóstico de la expresión de proteína MGMT (Tabla 2).

Autor/año	N	Histología	Método	Impacto en supervivencia		Factor pronostico indep en AM
				SG	SLP	
Nakasu y cols. 2004	51	Gliomas Anaplas	IHQ	SI	--	SI
Brell y cols. 2005	93	75 AA 18 OA	IHQ	SI	NO	SI
Chinot y cols. 2007	28	GBM	IHQ	SI	SI	--
Nakasu y cols 2007	28	GBM	IHQ	NO	SI	NO
Wager y cols. 2008	296	169 GBM	IHQ	NO	--	NO

Capper y cols. 2008	162	75 GBM	IHQ	--	SI	--
Nakagawa 2009	31	GBM	IHQ	SI	--	SI
Rodriguez 2008	50	GBM	IHQ	NO	--	--
Cao y cols. 2009	73	GBM	IHQ	SI	--	SI
Sonoda y cols. 2010	62	GBM	Wester-Blot IHQ	NO	SI	SI
Tang y cols. 2010	172	GBM	IHQ	NO	NO	--
Preusser 2008	164	GBM	IHQ	NO	NO	--
Watanabe 2011	53	GBM	IHQ	NO	SI	--

Tabla 2: Principales estudios que evalúan el papel pronóstico de la expresión IHQ de proteína MGMT.

De los estudios publicados que analizan la relación entre expresión de MGMT por IHQ y supervivencia, el que incluye un mayor número de pacientes es el de Preusser y cols. (2008), que analiza 164 pacientes con GBM pertenecientes al estudio EORTC/NCIC 26981/22981 (Stupp y cols. 2005). En 122 de ellos se disponía además del estado de metilación del promotor de MGMT y de los datos de supervivencia. La mitad de los pacientes pertenecían a la rama de radioterapia exclusiva y la otra mitad a la rama de radioterapia y temozolamida. Dividen el valor de MGMT por IHQ en cuatro categorías: MGMT negativo (no inmuno reactividad en las células tumorales), MGMT bajo (< 10% de inmuno reactividad), MGMT moderado (10-50%) y MGMT alto (> 50%), no encontrando correlación con la metilación del promotor de MGMT, ni con la supervivencia. Otros dos estudios que analizan una larga serie de pacientes (Wager y cols., 2008, Tang y cols., 2011), tampoco encuentra relación entre la expresión proteica de MGMT y la supervivencia.

Sin embargo, estudios llevados a cabo con un menor número de pacientes si han podido demostrar dicha correlación. Así, Sonoda y cols. (2010)

han mostrado una asociación con SLP en 63 pacientes tratados con agentes alquilantes, la baja expresión de proteína MGMT predecía mejor SLP sin impacto en SG. Watanabe y cols (2011) relacionaron la expresión proteica de MGMT con los resultados clínicos en 53 pacientes con GBM. En este estudio los pacientes sin expresión de MGMT presentaban una mayor SLP de manera estadísticamente significativa, aunque sin impacto en la supervivencia global. No obstante, al analizar por separado los pacientes que habían recibido TMZ, se observó un beneficio también en SG, concluyendo que la no expresión de proteína MGMT puede ser un marcador para predecir la quimiosensibilidad. Recientemente, Niftherik y cols (2010) han aportado datos experimentales que apoyan esta teoría demostrando que la expresión proteica de MGMT en líneas celulares de GBM induce resistencia a TMZ, mientras que las que la expresaban eran sensibles.

Nosotros hemos analizado la expresión de MGMT mediante IHQ en nuestras muestras aplicando el sistema Bond™ Polymer Refine Detection (DS98009), que utiliza una moderna tecnología de polimerización controlada para preparar anticuerpos ligadores conjugados con conjugados con peroxidasa de rábano picante polimérica (HRP). El sistema de detección evita el uso de estreptavidina y biotina, eliminando así la tinción no específica producida por la biotina endógena y está especialmente indicado para la tinción de secciones de tejido incluido en parafina y fijados con formalina con el sistema automático Bond™. El objetivo es obtener unos resultados fiables, al no tener la variabilidad ínter observador, que puedan ser correlacionados con otros datos de nuestro estudio. Arazi y cols., (2011) analiza 46 muestras de GBM y gliosarcomas mediante un método cuantitativo digital (analySIS FIVE image-analysis software) y lo relacionan con el estado de metilación de MGMT por MSP y con los resultados obtenidos de forma visual (negativo, bajo < 10%, alto > 10%). Observan una correlación entre los resultados obtenidos de forma digital y de forma visual. También hubo una relación con metilación estableciendo el punto de corte en el 10%.

En nuestro estudio al analizar la expresión de proteína MGMT en el *global de los pacientes con glioblastoma multiforme no se encontraron diferencias significativas en supervivencia global, ni en tasa de respuestas radiológicas.*

Tampoco hubo diferencias en el grupo de pacientes del Hospital Sassary de Italia. En los pacientes pertenecientes al Hospital Virgen de las Nieves de Granada la expresión de proteína MGMT por inmunohistoquímica tampoco resultó ser factor predictivo de respuesta al tratamiento ni un factor pronóstico. La mediana de SG fue de 15 meses en los pacientes con baja expresión (+/- y +) frente a los 13 meses en los pacientes con alta expresión (++ y +++), como era de esperar, pero sin significación estadística. La única serie española (Balañá y cols., 2011) publicada hasta el momento que analiza el papel de la determinación de proteína MGMT por IHQ no consigue encontrar un punto de corte válido estadísticamente. La sensibilidad es alta, pero la especificidad es baja, por lo que concluyen que requiere confirmación mediante determinación del estatus de metilación.

Una posible explicación al hecho de no encontrar relación con la supervivencia es la regulación de la proteína por diversos mecanismos, entre los cuales se incluyen la quimioterapia, la radioterapia y los corticoides (Stupp y cols. 2007, Ueda y cols. 2004). Por tanto la expresión de la proteína en el momento del diagnóstico puede no ser la misma que durante el tratamiento. Además, la discusión sobre qué zonas del tumor evaluar, qué punto de corte es el óptimo, y la necesidad de distinguir las células MGMT positivas no tumorales sigue abierta. Nakasu y cols (2004) demostraron que en las muestras de gliomas de alto grado también hay otras células no tumorales que expresan MGMT, como son los macrófagos, las células endoteliales y los linfocitos B y T. Ellos usaron en las muestras con positividad intermedia (entre el 5 y el 20%) un doble marcaje (con CD3, CD20, CD68, GFAP) para diferenciar las células positivas para MGMT no neoplásicas. El porcentaje de estas células con doble marcaje nunca excedió del 10% y todas fueron negativas para GFAP. Por tanto si se elige un punto de corte óptimo (superior al 10%) la posibilidad de encontrar falsos positivos es mínima. En este estudio determinaron que la no expresión de MGMT por IHQ era un factor pronóstico de SG, con diferencias significativas entre los grupos usando como punto de

corte el 10%. Capper y cols. (2008) también encontraron una relación significativa en GBM usando como punto de corte 15%, pero no en Astrocitomas anaplásicos (AA), aunque no especifican el tratamiento post-operatorio que recibieron.

Podemos concluir pues que en base a nuestros resultados y a los de otros autores y a la espera de futuros y más amplios estudios que analicen la expresión de MGMT mediante inmunohistoquímica en GBM, la determinación de esta proteína no puede sustituir la determinación del estatus de metilación de MGMT.

Relación entre la expresión de la proteína MGMT por IHQ y la metilación del promotor de MGMT.

Los diversos estudios que han explorado la expresión de proteína MGMT por IHQ y la metilación del promotor MGMT por MSP muestran resultados discordantes (Tabla 3). Mientras que dos amplios estudios (Preusser y cols. 2008, Rodríguez y cols. 2008) no encuentran relación alguna, dicha relación es estadísticamente significativa en otras dos series (Ariza y cols. 2011, Sonoda y cols. 2010). Al igual que ocurre cuando se intenta analizar el valor pronóstico de proteína MGMT los puntos de corte usados por los diversos autores son muy variables.

Autor/año	N	Histología	Método metilación	Método IHQ	Correlación significativa estadísticamente
Cao y cols. 2009	73	GBM	MSP	MT3.1	NO
Metellus y cols. 2009	22	GBM	MSP	MT3.1	SI
Sonoda y cols. 2009	39	GBM	MSP	MT3.1	SI
Nakagawa y cols. 2009	11	GBM	MSP	MAB16200	SI

Preusser y cols. 2008	122	GBM	MSP	MT3.1	NO
Rodriguez y cols. 2008	50	GBM	MSP	MT3.1	NO
Ariza y cols. 2011	46	GBM	MSP	MT3.1	SI

Tabla 3: Principales estudios que evalúan la correlación entre metilación del promotor de MGMT y la expresión IHQ de proteína MGMT en GBM.

Los resultados globales de nuestra serie demuestran la no existencia de correlación significativa entre la expresión de MGMT por IHQ y la metilación del promotor del gen MGMT por MSP.

Aunque en general se acepta que la metilación de las islas CpG del promotor de un gen implica una inhibición de la transcripción y el silenciamiento del mismo, debemos hacer diversas consideraciones. Según la hipótesis de Kudson (Kudson y cols., 2001) para que se produzca la inhibición completa de la función de un gen se precisa la pérdida de la función de los dos alelos de dicho gen, de tal modo que se precisaría de la metilación de ambos para la pérdida de función de MGMT. Podría por tanto existir de forma teórica una metilación monoalélica que sería detectable mediante MSP pero no sería suficiente para impedir la síntesis de proteína. También puede influir el grado de metilación del promotor, por lo que la metilación inferior al 100% o la metilación de un único alelo podría explicar la coexistencia de metilación y expresión proteica (Rood y cols., 2004, Shaw y cols., 2008). Estos autores muestran que el patrón de metilación es variable y que por debajo de un 50% de metilación no se produce silenciamiento del gen.

Como ya comentamos en el apartado anterior hay diversos mecanismos que podrían explicar la no relación entre metilación y proteína: la metilación monoalélica, el grado de metilación, y por supuesto la heterogeneidad tumoral propia de los gliomas y la contaminación con células no tumorales que expresan MGMT (células endoteliales, linfocitos,...). Todo indica que la regulación del gen es un fenómeno complejo en el que la hipermetilación del

promotor es sólo uno de los factores que influyen en la expresión final de la proteína, y que por tanto el análisis de la expresión de MGMT no seleccione el mismo grupo de pacientes que la determinación de la metilación del promotor.

En este contexto, la reciente demostración de que existe una discordancia entre la metilación del promotor de MGMT y, no ya la proteína, sino los niveles de expresión de mRNA de MGMT indica que probablemente otros mecanismos regulan la expresión de esta enzima (Kreth S y cols., 2011) y que posiblemente la metilación de su promotor y su expresión solas no sean suficientes para proporcionar información sobre el esperado curso clínico en pacientes con gliomas malignos que recibían quimioterapia con agentes alquilantes.

Everhard y cols (2009) investigaron cuáles eran las islas CpG que su metilación mejor reflejaba el nivel de expresión de mRNA. Analizaron la metilación de 52 sitios CpG mediante pirosecuenciación en 54 muestras de GBM, encontraron que 6 sitios CpG y 2 regiones CpG se relacionaban estrechamente con expresión de RNA y que además, la región investigada por MSP no se encontraba entre ellas.

El estudio exhaustivo realizado por Shah y cols (2011) ha demostrado una estrecha correlación entre el sitio exacto de la metilación en el promotor, su efecto en el silenciamiento del gen (expresión de mRNA y proteína MGMT) e incluso la posterior respuesta del paciente a la terapia (medida como SLP). Estos autores analizan la metilación de 97 sitios CpG en el promotor MGMT en 70 muestras de GBM mediante secuenciación de los DNA sometidos a bisulfito. Así, un total de 36 CpG se correlacionaron con la expresión de mRNA MGMT, 25 CpG se correlacionaron significativamente con la expresión de proteína MGMT y un total de 17 sitios CpG fueron factores predictivos de la SLP. Cabe destacar que siete sitios CpG (CpG 38, 73, 80, 81, 82, 86 y 89) mostraron correlación significativa con las tres variables: expresión de mRNA, expresión de proteína y la SLP (Tabla 4).

CpG site	distance from TSS	%Meth	Region	mRNA (ρ)	Protein (%concordance)	PFS (hazard ratio [95% confidence interval])
8	-448	78	R1, MLPA-R1	-0.159	61	1.881 [0.868-4.076]
22	-302	35	R2, MLPA-R2	-.407 ^{**}	58	2.460 [1.066-5.674] [†]
38 [#]	-181	33	R2	-.371 [†]	68 ^{**}	2.463 [0.995-6.098] [†]
73 [#]	53	35	R3	-.362 [†]	65 ^{**}	3.084 [1.063-8.948] [†]
75	65	35	R3, qMSP	-.376 ^{**}	68 ^{**}	1.590 [0.678-3.73]
76	68	28	R3, qMSP	-.452 ^{**}	58 [†]	1.688 [0.687-4.151]
77	72	28	R3, qMSP	-.453 ^{**}	58	2.153 [0.876-5.292]
78	82	26	R3, qMSP	-.384 ^{**}	52	1.186 [0.483-2.916]
80 [#]	89	43	R3, MLPA-R3	-.408 ^{**}	68 [†]	2.311 [1.021-5.23] [†]
81 [#]	94	37	R3	-.292 [†]	68 [†]	2.539 [1.076-5.992] [†]
82 [#]	100	37	R3	-.321 [†]	68 ^{**}	2.508 [1.102-5.711] [†]
86 [#]	142	39	R3	-.399 ^{**}	68 [†]	2.903 [1.17-7.2] [†]
87	155	43	R3, qMSP	-.334 [†]	68 [†]	1.786 [0.793-4.025]
88	160	24	R3, qMSP	-0.162	52	1.837 [0.638-5.289]
89 [#]	172	54	R3, qMSP	-.338 [†]	71 [†]	2.255 [1.071-4.748] [†]

ρ = Spearman's rank correlation coefficient.
[†]p-value <0.05.
^{**}p-value <0.01.
[#]These seven CpG sites are significantly correlated with all three measures: MGMT mRNA expression, protein expression and progression-free survival.

*Tomado de Shah (2011)

Tabla 4: Correlación individual de los CpG del promotor de MGMT con expresión de RNAm, proteína MGMT y SLP*.

La secuenciación del promotor del gen de MGMT ha mostrado que el patrón de metilación puede ser variable, tanto desde el punto de vista cuantitativo (porcentaje de sitios CpG metilados) como cualitativo (mayor frecuencia de metilación de determinados sitios frente a otros), y que además sólo unos pocos de los sitios CpG son los que se relacionan con la expresión proteica y el pronóstico.

Determinación de la población de células madre de gliomas (GCS) mediante la expresión de CD133 por inmunohistoquímica.

Las GCS son altamente resistentes a la quimioterapia, incluyendo la temozolamida (Liu y cols. 2006), y a la radioterapia (Bao y cols. 2006). La quimio-radio resistencia de este subgrupo celular, junto a su capacidad inherente de autorrenovación, podría ser la responsable de la corta supervivencia de los pacientes con gliomas de alto grado.

Partiendo de la hipótesis de que las células madre de gliomas (GCS) son la reserva quimio-resistente de los gliomas malignos y que se pueden identificar a través de la proteína de superficie CD133, analizamos de forma retrospectiva 78 pacientes con glioblastoma multiforme (GBM) con el fin de identificar grupos pronósticos y su valor predictivo de respuesta al tratamiento con temozolamida y radioterapia concurrente y por tanto establecer que pacientes son los que más se van a beneficiar del tratamiento.

Las GCS se encuentran entre las primeras células en ser definidas como una pequeña subpoblación de células CD133+ (Shing y cols., 2003 y 2004). Sin embargo algunos estudios han demostrado una proporción excepcionalmente elevada de células CD133+ (30-60%) en gliomas humanos (Zhang y cols. 2008, Zeppernick y cols. 2008) mientras que otros han descrito GBM que no contenían células tumorales CD133 positivas pero en los que se identificaron CSC CD133 negativas que se asemejaban en términos de diferenciación y tumorigenicidad a las CD133 positivas (Beier y cols., 2007, Joo y cols., 2008).

Los anticuerpos normalmente usados (AC133 y AC141 mAbs) reconocen los epitopos glicosilados de CD133. Existe la posibilidad de que el estado de glicosilación de CD133, más que la expresión de la proteína en sí misma, pueda actuar como un marcador indirecto del fenotipo de CSC. Lo deseable sería descubrir otros marcadores adicionales que intervengan en el mantenimiento del fenotipo de CSC (Bidlingmaier y cols. 2008) y/o usar otros anticuerpos que reconozcan epitopos de CD133 no glicosilados (H-284, C24B9, 32AT1672) para evitar falsos negativos de CD133 (Figura 2).

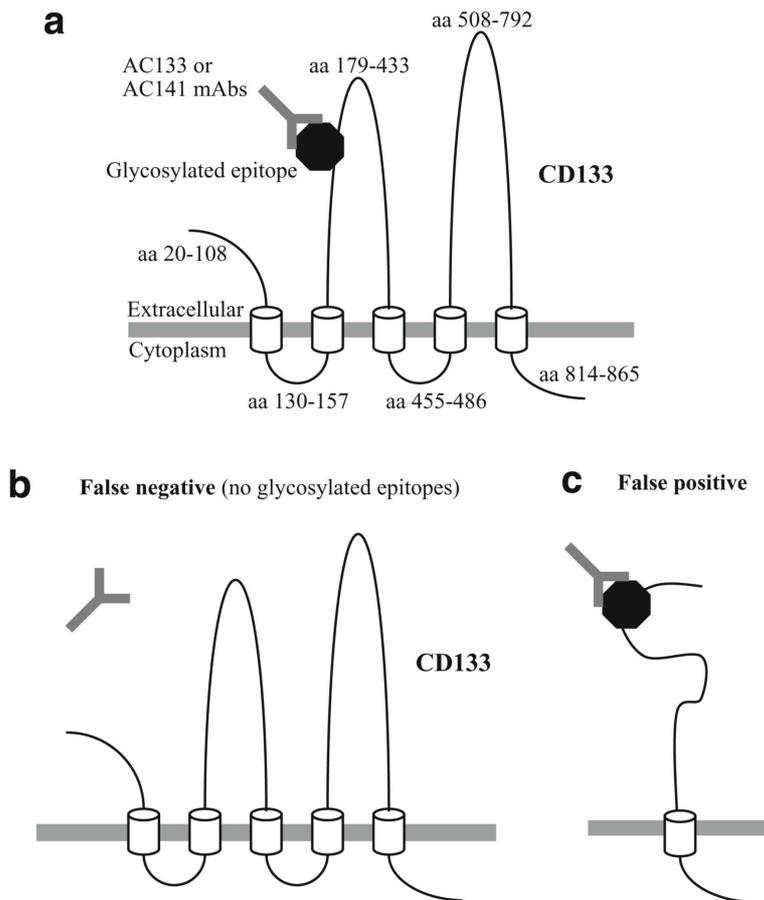


Figura 2: Limitaciones del uso de AC133/AC141 para detectar CD133 como marcador de GCS (Adaptado de Bidlingmaier y cols. 2008).

Se ha visto que la expresión de CD133 es factor pronóstico de supervivencia en varios estudios (Beier y cols, 2008, Pallini y cols. 2008, Zeppernick y cols. 2008, Zhang y cols. 2008). Sin embargo la dificultad está en determinar el punto de corte óptimo, debido a la gran variabilidad observada. En esta variabilidad podría influir la técnica de preparación de la muestra, el anticuerpo usado, el tiempo empleado y la variabilidad intra e ínter observador propia de las técnicas de inmunohistoquímica.

Como describimos en la metodología, en nuestro estudio de expresión de CD133 se ha utilizado el sistema Bond™ Polymer Refine Detection (DS98009) y como anticuerpo, el policlonal 19898 (Abcam). En el estudio global de los pacientes con GBM, la expresión de CD133 por IHQ no fue factor pronóstico de supervivencia ni factor predictivo de respuesta al tratamiento. No obstante, cuando se analizó de forma independiente el *subgrupo de pacientes pertenecientes al Hospital Virgen de las Nieves*, la expresión de CD133 por inmunohistoquímica si alcanzó la significación estadística en supervivencia global, que fue de 13 meses en los pacientes con baja expresión (+) frente a 20 meses en los pacientes con alta expresión (++)/+++ (p=0.05).

Este dato viene a contradecir lo observado en otros estudios en los que la alta expresión es un factor adverso o bien no tiene efecto sobre la supervivencia (Tabla 5) y viene a sumarse a la hipótesis de que el papel de CD133 como marcador pronóstico es discordante.

Autor/año	N	Histología	Método	Impacto en supervivencia		Factor pronostico indep en AM
				SG	SLP	
Beier y cols. 2008	20	10 GBM con Olig 4 ODA 6 OA	IHQ (293C3) Cultivo FACS	-- < 3%, no esferas, buen pronóstico > 3%, si esferas, mal pronóstico	SI	--
Joo y cols. 2008	20	GBM	FACS (AC133)	-- CD133 < 3% mal pronóstico	SI	--
Pallini y cols. 2008	44	GBM	IHQ (293C3)	SI CD133 ≥ 2%, mal pronóstico CD133+/Ki67+, mal pronóstico	SI	SI
Zeppernick y col. 2008	95	44 GBM Otros grados	IHQ (AC133)	SI CD133 > 1%, mal pronóstico Organización de CD133 en cluster, mal pronóstico	SI	SI
Zhang y cols. 2008	125	48 GBM Otros grados	IHQ (ABCG2)	SI CD133 3+, peor pronóstico Nestin 3+, peor pronóstico Nestin 3+/CD133 3+, peor pronóstico	--	SI, pero sólo Nestin 3+/CD133 3+
Metellus y cols. 2011	48	GBM	PCR-QRT (RNAm)	SI Alta expresión, mal pronóstico	SI	SI

Pallini y cols. 2011	37	GBM (reCIR)	FACS (AC133)	SI Incremento de recurrencia, buen pronóstico	SI CD133 en la	--
Kim y cols. 2011	88	GBM	IHQ (ab19898)	NO	NO	--

Tabla 5: Principales estudios que evalúan el papel pronóstico de la expresión de CD133.

En este contexto, un reciente estudio que compara en 37 pacientes reintervenidos la expresión de CD133 por FACScan antes de iniciar el tratamiento con RT/TMZ y tras la progresión, (Pallini y cols. 2011), apoya nuestros resultados, encontrando que el incremento de expresión de CD133 resultó ser un factor pronóstico favorable de SG y SLP. Estos hallazgos contradicen en parte la hipótesis de las “stem cells” como células que inducen la resistencia y la rápida regeneración del tumor aunque una posible explicación se encuentre en la demostrada heterogeneidad de las células CD133+ en la muestra obtenida. Es por ello que proponen el empleo de otros marcadores conjuntos para diferenciar las células CD133+ tumorales de las no tumorales (como Ki-67). Hipotizan que en los tumores recurrentes la fracción de células CD133+ puede estar constituida por GCS y otras células stem-like (como las “stem cells” neuronales endógenas y otras). En un modelo de ratones (Glass y cols., 2005) se ha visto una atracción de células precursoras endoteliales que se asocia con un aumento de la supervivencia debido a su acción antiproliferativa y proapoptótica.

Joo y cols (2008) estudiaron muestras de 20 pacientes con GBM, agrupándolos según su expresión de CD133 por FACScan en alta expresión ($\geq 3\%$) y baja expresión ($< 3\%$) del antígeno. No observaron diferencias en la capacidad de formación de neuroesferas de ambos grupos. El grupo de baja expresión de CD133 tuvo una mayor tasa de progresión, hecho que atribuyeron a que tenían una mayor tasa de expresión de los genes de los subtipos mesenquimal y proliferativo, y por tanto con peor pronóstico, mientras que el grupo de alta expresión de CD133 tenía una sobre regulación de los genes del subtipo proneuronal. También aislaron células CD133+ y CD133- y las

transplantaron en ratones inmuno deprimidos, no observando diferencias en la capacidad de formación de tumores.

Sin embargo, otros estudios soportan la hipótesis de que la alta expresión de CD133 en estos tumores se relaciona con un mal pronóstico. Beier y cols., (2008) analizaron el impacto pronóstico de la expresión de CD133 en tumores oligodendrogiales de alto grado, dentro de los cuales se incluían 10 pacientes con GBM con componente oligodendrogial. Observaron que la expresión de CD133 mayor al 3% confería menor SLP de forma significativa, al igual que la capacidad de formación de neuroesferas, pero el análisis lo realizaron en el global de los pacientes, el cual incluía también tumores de grado III.

Por otra parte Pallini y cols., (2008) analizaron de forma prospectiva 44 pacientes con GBM tratados con cirugía y quimiorradioterapia con temozolamida. El 32% de los GBM generó CSC y hubo una menor SG y SLP de forma significativa en comparación con los que no las formaron. Además los tumores con una mayor proporción de CD133 formaron más CSC. En el análisis univariable no hubo relación entre el porcentaje absoluto de expresión de CD133 y la supervivencia, aunque sí la hubo cuando agruparon los pacientes usando como punto de corte la media de expresión del total de la serie, de tal modo que aquellos pacientes con $CD133 \geq 2\%$ tuvieron menor SG y SLP de forma estadísticamente significativa. Un resultado muy interesante fue que la co expresión de CD133+/Ki67+ frente a CD133/ki67- fue un factor pronóstico adverso, postulando que la presencia de "stem cell" sería sólo relevante si tuviesen actividad proliferativa y que este subgrupo podría representar la verdadera población tumorigénica más que el total de las células CD133+, asumiendo que la proliferación de las "stem cells" neuronales es muy rara. En el análisis multivariante tanto la generación de CSC in Vitro, $CD133 \geq 2\%$ y CD133+/Ki67+ fueron factores pronósticos independientes.

También ese mismo año, Zeppernick y cols., (2008) estudiaron 95 gliomas de diversos grados (entre los que se incluían 44 GBM) observando diferencias en la expresión de CD133 entre los tumores de diferente grado, siendo la expresión muy superior en gliomas grado IV. Hubo diferencias significativas en SG y SLP en función de la expresión de $CD133 \leq 1\%$ o $> 1\%$, aunque dicho análisis fue en el global de los pacientes. En el análisis

multivariante la expresión de CD133 > 1% y su organización en cluster fueron factores pronósticos independientes de SG. No sabemos que ocurriría si se analizaran por separado los GBM, puesto que el porcentaje de expresión de CD133 es superior en los GBM (el 96% tenía niveles > 1%) cabe la duda de que esta diferencia en supervivencia se deba al grado del tumor y no al porcentaje de expresión de CD133.

Algo parecido ocurre en el estudio de Zhang y cols., (2008), quienes analizaron 125 gliomas grado II-III-IV (48 GBM), sin separar por histologías. Sus resultados demuestran una mayor expresión de CD133 en los gliomas de alto grado en comparación con los de bajo grado. La expresión de CD133 3+ (que se correspondía con un porcentaje de expresión de CD133 > 60%), Nestin 3+, y la co expresión de ambos se asociaron a menor SG de forma significativa. En el análisis multivariante sólo fue factor pronóstico la co expresión CD133 3+/Nestin 3+.

Un estudio prospectivo de una única institución sobre 44 GBM ha sido el primero en mostrar que la alta expresión de RNAm de CD133 en GBM tratados de forma homogénea con cirugía y quimiorradioterapia con temozolamida era factor pronóstico adverso independiente de supervivencia global y libre de progresión (Metellus y cols., 2011), manteniéndose el impacto tanto en pacientes metilados como no metilados. Además junto a metilación de MGMT diferenciaba tres grupos pronósticos: los pacientes de mejor pronóstico eran aquellos metilados con baja expresión de CD133 (mediana de supervivencia global de 40 meses), los de peor pronóstico los no metilados con alta expresión de CD133 (11 meses), y otro grupo intermedio donde estaban el resto (20 meses).

Por el contrario un reciente estudio analiza una gran serie de pacientes Coreanos con GBM tratados también de forma homogénea con RT/TMZ, no mostró asociación entre la expresión de marcadores de GCS (Nestin, CD133, CD 15) y la supervivencia (Kim y cols., 2011).

Podemos concluir que son pocos los estudios que exploran el papel pronóstico de la expresión de CD133 como marcador de CSC y que los realizados usan métodos diferentes (PCR-QRT, IHQ, FACS) lo que hace difícil su comparación. La mayoría son estudios retrospectivos y con series no homogéneas que incluyen tanto gliomas de alto grado como de bajo grado. De

los estudios con muestras homogéneas de GBM tratados de la misma manera disponemos de resultados discordantes; dos de ellos muestran que la alta expresión de CD133 es un factor pronóstico desfavorable (Pallini y cols., 2008; Metellus y cols., 2011), otros dos que la alta expresión de CD133 es un factor pronóstico favorable (Joo y cols., 2008; Pallini y cols., 2011) y otro no encuentra relación entre la expresión de CD133 y la supervivencia (Kim y cols., 2011).

Posiblemente, y como ya hemos comentado, uno de los principales problemas para obtener conclusiones fiables es la metodología para la determinación de la expresión de CD133 y el establecimiento de un punto de corte óptimo. Diferentes autores utilizan cuantificación de RNAm por PCR-RT (Metellus y cols., 2011), otros por inmunohistoquímica (Zhang y cols., 2008, Pallini y cols., 2008, Zeppernick y cols., 2008, Kim y cols., 2011) o por citometría de flujo (Beier y cols., 2008, Joo y cols., 2008, Pallini y cols., 2011). Además, los datos usando cuatro diferentes anticuerpos frente a CD133 (AC133, W6B3C1, C24B9 y ab19898) se muestran inconsistentes (Hermansen y cols., 2011) en las mismas muestras de GBM, lo que indica que la detección de CD133 como marcador de GCS es problemática. En los estudios que emplean como técnica de detección la IHQ no se ha visto impacto pronóstico con el empleo de otros anticuerpos diferentes de AC133 (Zeppernick y cols., 2008) y 293C3 (Beier y cols., 2008, Pallini y cols., 2008), lo que sugiere que las células que expresan estos antígenos son diferentes de las células CD133 que expresan otros antígenos determinados por otros anticuerpos. Por lo tanto lo más probable es que el impacto pronóstico no se deba a la expresión de proteína CD133 sino de unos determinados antígenos. Beier mostró que la detección de CD133 mediante 293C3 se relaciona con peores resultados clínicos y que además al aislar dichas células CD133+ mediante citometría de flujo eran capaces de formar neuroesferas e inducir tumores en ratones desnudos, características de las células madre tumorales (Beier y cols., 2008).

Por tanto debemos hacernos dos preguntas importantes; la primera es si las células CD133+ positivas aisladas mediante citometría de flujo son idénticas a las determinadas mediante inmunohistoquímica, y la segunda si el uso de diferentes anticuerpos interfiere en los resultados. Además, no debemos olvidar que también se han identificado GCS CD133- (Beier y cols., 2007). Sin

embargo el empleo de AC133 mediante citometría de flujo (Joo y cols., 2008, Pallini y cols., 2011) mostró que la alta expresión se asociaba a mejor supervivencia.

Pero ¿qué ocurre cuando se investiga el papel de CD133 como marcador pronóstico y de CSC en otros tumores? (Tabla 6). El adenocarcinoma pancreático (Immervoll y cols., 2008) presenta un alto porcentaje de positividad (80%) y este porcentaje es similar cuando se realiza con diversos anticuerpos frente a distintos antígenos (AC133, AC141, K-18), aunque no posee impacto pronóstico. En cáncer de colon también ha sido ampliamente estudiado, identificando CSC usando el marcador CD133 (O'Brien y cols., 2007), las cuales eran capaces de inducir el mismo tumor en ratones inmunodeficientes (Ricci-Vitiani y cols., 2007). Al analizar el impacto pronóstico de la expresión de CD133 por IHQ en cáncer de colon, dos estudios diferentes muestran que la alta expresión es un factor pronóstico desfavorable (Horst y cols., 2008, Kojima y cols., 2008). Debemos decir no obstante, que el punto de corte usado en los estudios para considerar alta expresión difiere mucho (10% vs. 50%). El marcador CD133 también ha resultado ser un factor pronóstico adverso de supervivencia global en adenocarcinomas gástricos (Zhao y cols., 2010). En cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNCP) la expresión de CD133 no tuvo impacto pronóstico, aunque encontraron una relación con la expresión de proteínas relacionadas con la resistencia a drogas (Salnikov y cols., 2010). En contraste, en otros dos tipos de tumores la expresión de CD133 por IHQ ha resultado ser un dato favorable. En el carcinoma de células renales la SLP a 5 años fue superior en los pacientes con alta expresión de CD133 (83% vs. 66%, $p=0.01$) y en el análisis multivariante el grupo con baja expresión de CD133 tenían una mayor probabilidad de progresión de la enfermedad y una mayor probabilidad de muerte por cáncer de forma estadísticamente significativa (da Costa y cols., 2011). Finalmente, en colangiocarcinomas la expresión de CD133 disminuye al aumentar el grado de diferenciación y la expresión de CD133 predice un mejor resultado de forma estadísticamente significativa (Fan y cols., 2011). Por tanto en otros tumores sólidos ocurre algo similar a lo observado en gliomas. Los datos de los que disponemos son discordantes, tanto en resultados, expresión de CD133 y técnica usada.

Autor/año	N	Tumor	Método	Impacto en supervivencia		Factor pronóstico indep en AM
				SG	SLP	
Immervoll 2008	51	Páncreas	IHQ (AC133)	NO	--	--
Horst y cols. 2008	57	Colon	IHQ (AC133, C24B9)	SI CD133 > 50%, mal pronóstico	--	SI
Kojima y cols. 2008	189	Colon	IHQ (AC133)	SI CD133 + (> 10%), mal pronóstico	NO	--
Salnikov y col. 2010	88	Pulmón (CPNCP)	IHQ	NO	--	--
Zhao y cols. 2010	336	Gástrico	IHQ	SI CD133 + (≥ 5%), peor pronóstico	--	--
Da Costa y cols. 2011	142	Renal	IHQ (ab19898)	SI Alta expresión de CD133, mejor pronóstico	SI	SI
Fan y cols. 2011	55	Colangio	IHQ (C24B9)	SI CD 133+ (> 10%), buen pronóstico	--	SI

Tabla 6: Principales estudios que evalúan el papel pronóstico de la expresión de CD133 en otros tumores sólidos.

En nuestra serie, la expresión de CD133 determinada tanto por inmunohistoquímica como por inmuno reactividad nuclear fue muy elevada en comparación con los datos aportados por estudios similares realizados hasta la fecha. Sólo los resultados obtenidos por Zhang y cols. (2008) se asemejan a los mostrados en nuestro análisis. Una posible explicación a tan elevada expresión sería la contaminación con otras células no tumorales que también expresan CD133, ya que a diferencia de otros grupos, nosotros usamos un marcaje simple (como la propuesta por Pallini y cols de usar de forma conjunta el marcaje de Ki-67 para diferenciar las células tumorales de las no tumorales). Aunque CD133 ha sido ampliamente utilizado como marcador de GCS, el hecho de que también lo expresen las stem cells neuronales y sus precursores puede interferir en los resultados. A esto debemos añadir la diferente intensidad de marcaje que los distintos anticuerpos monoclonales generados

frente a CD133 pueden provocar en muestras de glioblastoma multiforme. Como señala Hermansen y cols. (2011), la utilización de diferentes anticuerpos primarios frente a CD133 puede originar resultados no completamente solapables y en este sentido la comparación directa de estudios con diferentes clones debe ser realizada con mucha precaución. En nuestro estudio ha sido utilizado el anticuerpo ab19898, también utilizado recientemente por Kim y cols., (2011), quienes, al igual que nosotros, no encuentran diferencias en la supervivencia en función de la expresión de CD133. No obstante, cabe señalar como diferencia fundamental entre ambos estudios que mientras que en nuestra serie el 70% de los pacientes presentaban una expresión $> 5\%$ (siendo $> 25\%$ en el 33% de las muestras), en el estudio de Kim la mayoría tenían una expresión $\leq 1\%$. Esto se podría explicar por las limitaciones de la propia técnica de IHQ.

Por otra parte, el descubrimiento de GCS CD133 negativas junto a la presencia de esta proteína en células que no necesariamente tienen que ser tumorales, como acabamos de ver, limita su finalidad discriminativa. En este sentido otros marcadores de superficie, como CD15 (Read y cols., 2009, Ward y cols., 2009), L1CAM (Bao y cols., 2008) y A2B5 (Ogden y cols., 2008), están siendo empleados para tal fin. De todos ellos quizás L1CAM es el más prometedor. Esta glicoproteína de superficie que regula el crecimiento de las células neuronales, la supervivencia, la migración y la invasión celular. Juega un papel fundamental en las funciones de las GCS y se expresa más en éstas que en las stem cells neuronales y sus precursores, aunque los datos proceden de estudios en líneas celulares y ratones inmuno deprimidos.

Hasta el momento la definición de las CSC es una definición funcional y no se puede basar en la determinación de un único marcador. CD133 como marcador de GCS sólo se ha validado usando clasificación celular mediante citometría de flujo y magnética (Singh y cols. 2003). Por tanto el empleo de CD133 como caracterización morfológica de las GCS debe ser evaluado de forma crítica en futuros estudios.

Análisis de otros factores pronósticos y de respuesta en Glioblastoma multiforme.

El análisis de otros factores pronósticos y predictivos de respuesta en Glioblastoma multiforme fue realizado utilizando sólo en el grupo de pacientes del que disponíamos de todos los datos, el grupo de HUVN.

El análisis de la respuesta radiológica en estos pacientes no se correlacionó de forma estadísticamente significativa entre la tasa de respuestas y el sexo, la localización tumoral, el tiempo de evolución de la clínica ni el tipo de cirugía realizada. No obstante, sí hubo diferencias significativas en el número de ciclos de temozolamida recibidos, de forma que aquellos pacientes que recibieron un mayor número de ciclos obtuvieron una mayor tasa de respuestas ($p=0.002$). También hemos de destacar que se observaron diferencias significativas en relación a los implantes de carmustina mediante el test de Fisher ($p=0.005$). Los pacientes sometidos a este tratamiento no obtuvieron respuesta radiológica y progresaron todos, mientras que el 53,8% de los no tratados sí la obtuvo.

En el análisis de la supervivencia libre de progresión se encontraron diferencias significativas en función de la edad (mayor supervivencia libre de progresión en los menores o iguales de 50 años, 15 vs. 8 meses, $p=0.011$) y el tiempo de evolución de la clínica (mayor supervivencia libre de progresión en los que tuvieron un tiempo de evolución de la clínica > 3 meses, 32 vs., 8 meses, $p=0,016$). Estos dos factores son factores pronósticos ampliamente reconocidos.

También se encontraron diferencias en SLP en función de la aplicación de implantes de carmustina observándose, de forma sorprendente, una mayor supervivencia libre de progresión en aquellos pacientes que no los recibieron (8 vs. 5 meses, $p=0,001$). Este hallazgo, contrario a lo esperado, se podría explicar por el escaso número de pacientes analizados. Además todos recibieron tratamiento con RT y TMZ, mientras que el estudio de Westhaptl de 2003 que dio la indicación al empleo de dichos implantes empleaba como tratamiento adyuvante RT exclusiva y prohibía el empleo de quimioterapia hasta la progresión (excepto en los oligodendrogliomas anaplásicos). El

objetivo principal fue SG, pero no mostró beneficio en SLP, ni especifica que porcentaje de pacientes recibieron quimioterapia a la progresión. Por tanto, el beneficio de la carmustina pudo deberse al factor de confusión de QT de 2º línea. Hoy en día, desde la estandarización del empleo de la Temozolamida en primera línea como parte del tratamiento adyuvante, el papel de los implantes de carmustina permanece sin estudiar.

En cuanto a la supervivencia global, el tiempo de evolución de la clínica no tuvo impacto pronóstico. Sí lo tuvo de nuevo la edad (mayor supervivencia global en los menores o iguales de 50 años, 20 vs. 13 meses, $p=0.013$).

Por último se analizó la expresión de p53 y Ki-76 mediante IHQ determinando sus posibles correlaciones estadísticas. **P53** es un factor de transcripción con múltiples funciones en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN y la apoptosis. La pérdida de función de la proteína p53 es la alteración genética más frecuentemente identificada en tumores sólidos. La región cromosómica que codifica esta proteína, la 17p13, se encuentra delecionada o alterada en un 30% de los astrocitomas de cualquier grado de malignidad. El estudio de p53, utilizando como punto de corte el percentil 50 (5%) (el percentil 25 fue 0%), no demostró ninguna correlación ni con la supervivencia global, ni libre de progresión, concluyendo que no existe relación entre p53 y el pronóstico. Por otra parte se analizó la expresión de **Ki-67**, un antígeno de proliferación que se expresa durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular. Una característica general de los tumores sólidos es la alta asociación entre la actividad proliferativa y el grado de agresividad tumoral. En nuestro estudio, utilizamos como punto de corte para Ki-67 el percentil 25 (14%). Así, la mediana de supervivencia de los pacientes con expresión de Ki67 < 14% fue de 19 meses frente a los 13 meses de los pacientes con expresión $\geq 14\%$. Estas diferencias rozaron la significación estadística ($P=0.09$). No obstante, aunque aquellos pacientes con tumores que mostraban un índice de proliferación bajo tuvieron una mayor supervivencia que los tumores con índice de proliferación alto, como era esperable, no se alcanzó la significación estadística. Una posible explicación es el escaso tamaño muestral, ya que el análisis sólo se pudo realizar en un porcentaje del subgrupo de pacientes del Hospital Virgen de las Nieves de Granada.

Análisis de los pacientes reintervenidos: cambios en metilación y expresión inmunohistoquímica de MGMT y CD133.

Nuestro trabajo de investigación ha incluido también un interesante estudio sobre 11 pacientes que habían sido sometidos a reintervención por progresión tumoral tras el tratamiento con radioterapia y temozolamida y de los que disponíamos también de muestra de la segunda cirugía. En este grupo de pacientes y sobre esta segunda muestra hemos podido determinar el estatus de metilación del promotor de MGMT y la expresión de MGMT y CD133 por IHQ lo que nos ha permitido, a pesar de lo limitado del número de muestras, hacer una aproximación a los posibles cambios en las variables objeto de estudio en relación con la administración del tratamiento con radioterapia y agentes alquilantes.

En cuanto al estatus de metilación de MGMT, se pudieron analizar 10 pacientes antes y después del tratamiento. En cuatro de ellos (40%) se produjo modificación del estado de metilación, lo que representa un porcentaje algo superior a lo observado por otros grupos (Jung y cols., 2010, Brandes y cols., 2010). Tres pacientes metilados pasaron a convertirse en no metilados y uno no metilado a metilado, sin que ninguno de estos cambios supusiese diferencias en supervivencia. Nuestros resultados, por tanto, no son suficientes para determinar si existe un claro cambio en el patrón de metilación del promotor de MGMT en base a la administración del tratamiento y si esta metilación mantiene su papel pronóstico durante la evolución de la enfermedad.

Brandes y cols. (2010) realizaron un análisis retrospectivo de 44 pacientes con GBM tratados con radioterapia y temozolamida y reintervenidos a causa de progresión tumoral. La inclusión de sujetos en los que había transcurrido al menos 3 meses desde la primera cirugía, excluía la presencia de pseudo progresiones. El estudio de metilación en las muestras de las dos cirugías pudo ser realizado en 38 pacientes, determinándose que el estado de metilación cambió en 14 pacientes (37%), hecho que ocurrió con mayor frecuencia en metilados (61,5% vs. 24%, $p=0.03$). Sin embargo la mediana de supervivencia global sólo estuvo significativamente influenciada por el estado de metilación de la primera cirugía, no teniendo valor pronóstico el resultado en la segunda cirugía. Algo similar mostraron Jung y cols. (2010) al analizar 16

pacientes reintervenidos tratados con temozolamida. El estado de metilación cambió en el 28% de los pacientes, sobre todo en metilados (4 de los 5 que cambiaron) y el 83% mostró cambio en la expresión de proteína MGMT, mostrando niveles más altos en la segunda cirugía.

Por otra parte, y en cuanto a la expresión de MGMT en nuestra serie de 11 pacientes reintervenidos, pudimos realizar dicha determinación en 10 muestras de las dos cirugías. Nuestros resultados muestran un cambio de expresión proteica en 4 pacientes (40%) con un aumento de expresión en dos de ellos y una disminución en otros dos. Dicha modificación no guardó relación con el cambio en metilación del promotor de MGMT, ni tampoco con la supervivencia. La proteína MGMT es una enzima suicida, transfiriendo un grupo alquilo del átomo O⁶ de la guanina en el ADN de las células expuestas a agentes alquilantes a una cisterna interna en una reacción que inactiva de forma irreversible a una molécula de *MGMT* por cada lesión reparada. Esto daría lugar a una depleción de la proteína por los agentes alquilantes y se podría reflejar en el descenso de su expresión por IHC en los pacientes reintervenidos (incluso sin modificación del estatus de metilación). Jung y cols. (2008) también analizaron el cambio en la expresión de MGMT por IHQ en 18 pacientes reintervenidos, mostrando en 15 (83%) niveles más altos que los iniciales. Estos resultados sugieren el desarrollo por parte de estos pacientes de resistencia a la temozolamida, que además, es adquirida durante el tratamiento y que no depende sólo del cambio en metilación, que como se demostró, disminuyó en la segunda muestra.

Finalmente, se postula que las CSC deben ser la reserva quimiorresistente de estos tumores y quizás sean las responsables de la recurrencia. Aquí coexisten células CD133 positivas con CD133 negativas. Las GCS se caracterizan por altos niveles de MGMT RNA y proteína, sobre todo las CD133 negativas, por lo que podrían ser resistentes al tratamiento con TMZ. Se ha observado también in vitro que la TMZ no induce la muerte celular pero sí inhibe la proliferación en líneas celulares CD133 positivas, lo cual podría explicar los largos periodos sin evidencia de progresión. En nuestra serie de pacientes reintervenidos no observamos diferencias significativas en la expresión de CD133 entre la primera y la segunda cirugía, ni tampoco que en

los escasos pacientes que tuvieron diferencias en el nivel de expresión éstas tuviesen un efecto en la supervivencia.

Como ya se ha comentado, Pallini y cols (2011) compara en 37 pacientes reintervenidos la expresión de CD133 antes de iniciar el tratamiento con RT/TMZ y tras la progresión. En este estudio el incremento de expresión de CD133 en la segunda cirugía resultó ser un factor pronóstico favorable de SG y SLP.

Conclusions

1.- The methylation status of the MGMT enzyme, determined by the methylation-specific PCR (MSP), is a prognostic factor for survival and a predictive factor for the response to treatment with radiotherapy and temozolomide in patients diagnosed with glioblastoma multiforme (GBM).

2.- The level of MGMT, determined through immunohistochemical techniques, does not show a statistically significant correlation to neither survival nor the response to treatment with radiotherapy and temozolomide in patients with glioblastoma multiforme.

3.- Our results show that there is no statistically significant correlation between the methylation status of the MGMT promoter and the amount of MGMT protein in those patients, which suggests the existence of more complex mechanisms that regulate that enzyme's levels.

4.- The presence of glioma stem cells using immunohistochemical detection of CD133 was neither a prognostic factor for survival nor a predictive factor of the response to treatment in patients with glioblastoma multiforme.

5.- In the sub-group of patients from the Virgen de las Nieves Hospital in Granada, the presence of CD133 did have statistical significance in relation to overall survival that was greater for those patients with a high presence of the marker.

6.- Our results confirmed the prognostic value of progression-free survival of classic clinical factors, such as the age and the time of clinical evolution. However, contrary to expectations, treatment with carmustine implants was an adverse prognostic factor for progression-free survival. In the analysis of overall survival rates, only the age was a prognostic factor.

7.- The presence of molecular markers Ki-67 and p53, classically correlated to cellular proliferation and apoptosis, was not a significant prognostic factor for patients with glioblastoma multiforme.

8.- Our study on patients with reoperation due to progression of the disease after treatment with radiotherapy and temozolomide, showed variations in the methylation of the MGMT promoter and the presence of MGMT and CD133. These variations were not significant due to the small number of patients analyzed. Further studies are needed to confirm the effect of this treatment on the abovementioned markers.

Conclusiones

1.- El estado de metilación de la enzima MGMT, determinado mediante PCR específica de metilación (MSP), es factor pronóstico de supervivencia y factor predictivo de respuesta al tratamiento con radioterapia y temozolamida en pacientes diagnosticados de glioblastoma multiforme (GBM).

2.- El grado de expresión de MGMT, determinado mediante técnicas de inmunohistoquímica, no muestra una relación estadísticamente significativa ni con la supervivencia ni con la respuesta al tratamiento con radioterapia y temozolamida en pacientes con glioblastoma multiforme.

3.- Nuestros resultados demuestran que no existe una correlación estadísticamente significativa entre el estado de metilación del promotor de MGMT y el nivel de expresión de proteína MGMT en estos pacientes, lo que sugiere la existencia de mecanismos más complejos que regulan la expresión de esta enzima.

4.- La determinación de la población de células madre de gliomas mediante la detección inmunohistoquímica de CD133 no resultó ser factor pronóstico de supervivencia ni predictivo de respuesta al tratamiento en los pacientes con glioblastoma multiforme.

5.- En el subgrupo de pacientes pertenecientes al Hospital Virgen de las Nieves de Granada, la expresión de CD133 si alcanzó la significación estadística en relación a la supervivencia global, que fue superior en los pacientes con alta expresión del marcador.

6.- Nuestros resultados confirman el valor pronóstico en la supervivencia libre de progresión de factores clínicos clásicos como la edad y el tiempo de evolución de la clínica. No obstante, y de forma contraria a lo esperado, el tratamiento mediante implantes de carmustina fue un factor pronóstico adverso de supervivencia libre de progresión. En el análisis de supervivencia global sólo la edad resultó ser factor pronóstico.

7.- La expresión de los marcadores moleculares Ki-67 y p53, clásicamente correlacionados con la proliferación y la apoptosis celular, no mostraron significación pronóstica en los pacientes con glioblastoma multiforme.

8.- Nuestro estudio en pacientes reintervenidos por progresión de la enfermedad tras el tratamiento con radioterapia y temozolamida, mostró variaciones en la metilación del promotor de MGMT y en la expresión de MGMT y CD133, que no fueron significativas en base al reducido grupo de pacientes analizados. Se necesitarán estudios más amplios para confirmar la influencia de este tratamiento sobre los marcadores mencionados.

Bibliografía

Altaner C. Glioblastoma and stem cells. *Neoplasma* 2008; 55: 369-374.

Anda T, Shabani HK, Tsunoda K, y cols. Relationship between expresión of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione-S-transferase pi in glioblastoma and the survival of the patients treated with nimustine hydrochloride: an immunohistochemical análisis. *Neurol Res* 2003; 25:241-248.

American Cancer Society.: *Cancer Facts and Figures 2009*. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2009.

Apuzzo MLJ, Chandrasoma PT, Breeze RE. Application of image-directed stereotactic surgery in the management of intracranial neoplasms. En Heilbrun MP, ed. *Stereotactic Neurosurgery*. Baltimore: Wiliams & Wilkins, 1988.

Arazi Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, y cols. Quantitative digital assessment of MGMT immunohistochemical expression in glioblastoma tissue. *Brain Tumor Pathol* 2011; 28:25–31.

Arjona D, Bello MJ, Rey JA. EGFR intragenic loss and gene amplification in astrocytic gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 164:39-43.

Balañá C, Carrato C, Ramírez JL, y cols. Tumour and serum MGMT promoter methylation and proteína expresión in glioblastoma patients. *Clin Transl Oncol* 2011; 13:677-685.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, y cols. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; 444:756-760.

Bao S, Wu Q, Li Z, y cols. (2008). Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res* 2008; 68: 6043–6048.

Batchelor TT, Gilbert MR, Supko JG, y cols. Phase 2 study of weekly irinotecan in adults with recurrent malignant glioma: final report of NABTT 97-11. *Neuro Oncol* 2004; 6(1):21-7.

Beier D, Hau P, Proescholdt M, y cols. CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristic and Molecular Profiles. *Cancer Res* 2007; 67(9):4010-4015.

Beier D, Rohrl S, Pillai DR, y cols. Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Cancer Res* 2008; 68(14):5706-5715.

Beier D, Wischhusen J, Dietmaier W, y cols. CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. *Brain Pathology* 2008; 18:370-377.

Benyahia B, Huguet S, Decleves X, y cols. Multidrug resistance-associated protein MRP1 expression in human gliomas: chemosensitization to vincristine and etoposide by indomethacin in human glioma cell lines overexpressing MRP1. *J Neurooncol* 2004; 66:65-70.

Berrocal A, Pérez Segura P, Gil M, y cols. Extended-schedule dose-dense temozolomide in refractory gliomas. *J Neurooncol* 2010; 96:417-422.

Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B y cols. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med* 2008; 86(9):1025–1032.

Bleehen NM, Stenning SP. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *Br J Cancer* 1991; 64:769.

Blough MD, Zatliescu MC, Cairncross JC, y cols. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells. *Cancer Res* 2007; 67:580–584.

Brandes AA, Basso U, Reni M, y cols. First-line chemotherapy with cisplatin plus fractionated temozolomide in recurrent glioblastoma multiforme: a phase II study of the Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia. *J Clin Oncol* 2004; 22(9):1598-604.

Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, y cols. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol* 2008; 26(13):2192-7.

Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, y cols. Temozolomide concomitant and adjuvant to radiotherapy in elderly patients with glioblastoma. *Cancer* 2009; 115:3512-3518.

Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, y cols. O6-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Neuro-Oncology* 2010; 12(3):283-288.

Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, y cols. Temozolomide 3 weeks on and 1 week off as first-line therapy for recurrent glioblastoma: phase II study from gruppo italiano cooperativo di neurooncologia (GICNO). *Br J Cancer*. 2007; 95(9): 1155-60.

Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, y cols. Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: A prospective GICNO study. *J Clin Oncol* 2006; 24:4746-4753.

Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, y cols. Recurrence pattern after temozolomide concomitant with and adjuvant to radiotherapy in newly diagnosed patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status. *J Clin Oncol* 2009; 27:1275-1279.

Brandsma D, Stalpers L, Taal W, y cols. Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas. *Lancet Oncol* 2008; 9(5):453-61.

Brell M, Tortosa A, Verger E, y cols. Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11(14):5167-5174.

Brem H, Piantadosi S, Burger PC, y cols. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. *Lancet* 1995; 345:1008.

Burns KL, Ueki K, Jhung SL, y cols. Molecular genetic correlates of p16, cdk4, and pRb immunohistochemistry in glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57:122-130.

Cairncross G, Berkey B, Shaw E, y cols. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol* 2006;24(18): 2707-14.

Cao VT, Jung TY, Jung S, y cols. The correlation and prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas. *Neurosurgery* 2009; 65(5): 866-875.

Capper D, Mittelbronn MM, Meyermann R, y cols. Pitfalls in the assessment of MGMT expression and in its correlation with survival in diffuse astrocytomas: proposal of a feasible immunohistochemical approach. *Acta Neuropathol* 2008; 115(2): 249-259.

Castillo M, Kwock L, Mukherji S. Clinical application of proton MR spectroscopy. *Am J Neuroradiol* 1996; 17:1-15.

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

Cahill D, Levine KK, Betensky RA, y cols. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res* 2007; 13(7):2038-2045.

Chan DPC, Chan KF, To M, Yu Y, Cheung J L K , Cheng A F. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA P K S J. *Clin Pathol.* 2001; 54; 401-403.

Chinot OL, Barrie M, Fuentes S, y cols. Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 2007; 25:1470-1475.

Combs SE, Thilmann C, Edler L, y cols. Efficacy of fractionated stereotactic reirradiation in recurrent gliomas: long-term results in 172 patients treated in a single institution. *J Clin Oncol* 2005; 23:8863.

Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol.* 2005; 58; 894-895.

Criniere E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, y cols. MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities. *J Neurooncol* 2007; 83(2):173-179.

Da Costa WH, Rocha RM, da Cunha IW, y cols. CD133 immunohistochemical expression predicts progression and cancer-related death in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2011. DOI 10.1007/s00345-011-0769-x

Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, y cols. Grading of astrocytomas: a simple and reproducible method. *Cancer* 1988; 62: 2152-2165.

Dean M, Fojo T, Bates S, y cols. Tumour Stem Cells and Drug Resistance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:275-284.

Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, y cols. Phase II study of imatinib mesylate and hydroxyurea for recurrent grade III malignant gliomas. *J Neurooncol* 2007; 83(1):53-60.

Dietrich J, Imitol J, Kesari S. Mechanisms of disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. *Nature* 2008; 5:393-404.

Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol* 2005; 45:872-877.

Dunn J, Baborie A, Alam F, y cols. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *British Journal of Cancer* 2009; 101:124-131.

Emami B, Lyman J, y cols. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21:109.

Engels EA, Katki HA, Nielsen NM, y cols. Cancer incidence in Denmark following exposure to poliovirus vaccine contaminated with simian virus 40. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:532-539.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, y cols. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343(19):1350-4.

Esteller M, Fraga MF, Paz MF, y cols. Cancer epigenetics and methylation. *Science* 2002; 297:1807-1808.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, y cols. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Research* 1999; 59: 793-797.

Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, y cols. Identification of regions correlating *MGMT* promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol* 2009; 11(4):348-356.

Fan L, He F, Liu H, y cols. CD133: a potential indicator for differentiation and prognosis of human cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* 2011; 11:320-328.

Fatou A, Nanaszko MJ, Allen BB, y cols. Understanding the role of tumor stem cells in glioblastoma multiforme: a review article. *J Neurooncol* 2010; Sep 18. [Epub ahead of print]

Fine HA, Dear BG, Loeffler JS, y cols. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 1993; 71:2585.

Fraile M. Aplicaciones clínicas del SPECT cerebral. En: Carreras JL, Sopena E, Llamas F, Caballero O, eds. *Patología tumoral*. Barcelona: Masson S.A., 1994;66.

Franceschi E, Omuro AM, Lassman AB, y cols. Salvage temozolomide for prior temozolomide responders. *Cancer* 2005; 104(11):2473-6.

Franceschi E, Cavallo G, Lonardi S, y cols. Gefitinib in patients with progressive high-grade gliomas: a multicentre phase II study by Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO). *Br J Cancer* 2007; 96(7):1047-51.

Franco-Hernández C, Martínez-Glez V, Rey JA. Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugía* 2007; 18:373-382.

Friedman HS, Pluda J, Quinn JA, y cols. Phase I trial of carmustine plus O6-Benzylguanine for patients with recurrent of progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 2000; 18:3522-3528.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, y cols. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004; 64(19):7011–7021.

Garcia JL, Perez-Caro M, Gomez-Moreta JA, y cols. Molecular análisis of ex vivo CD133+ GBM cells revealed a common invasive and angiogenic profile but different proliferativo signatures amon high grade gliomas. *Cancer* 2010; 10:454-470.

Glanzt MJ, Cole BF, Forsyth PA, y cols. Practicar parameter: anticonvulsant profilaxys in patients with newly diagnosed brain tumors. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2000; 54:1886-93.

Gruber ML, Buster WP. Temozolomide in combination with irinotecan for treatment of recurrent malignant glioma. *Am J Clin Oncol* 2004; 27(1):33-8.

Hardell L, Hansson Mild K. Mobile phone use and risk of acoustic neuroma: results of the interphone case-control study in 5 North European countries [letter]. *Br J Cancer* 2006; 94:1348–1349.

Hegi ME, Diserens AC, Godard S, y cols. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1871-1874.

Hegi ME, Diserens C, Gorila T, y cols. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10):997-1003.

Hegi ME, Liu L, Herman JG, y cols. Correlation of O6-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4189-4199.

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, y cols. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *PNAS* 1996; 93:9821- 9826.

Hermansen SK, Christensen KG, Jensen SS, y cols. Inconsistent immunohistochemical expression patterns of four different CD133 antibody clones in glioblastoma. *J Histochem Cytochem* 2011, 59(4):391-407.

Hernán Vélez A, William Rojas M, Jaime Borrego R, Jorge restrepó M. En: *Radiología e imágenes diagnósticas* (2º ed). Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2004.

Horst D, Kriegl L, Engel J, y cols. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2008; 99:1285-1289.

Huncharek M, Muscat J. Treatment of recurrent high grade astrocytoma; results of a systematic review of 1,415 patients. *Anticancer Res* 1998; 18(2B):1303-11.

Immervoll H, Hoem D, Sakariassen PO, y cols. Expression of the “stem cell marker”. CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2008; 8:48.

Jiménez G, Villalobos MJ, Jiménez E, Palma W. Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*. 2007; vol. 1; num1, art.2.

Jin F, Zhao L, Zhao HY, y cols. Comparison between cells and cancer stem like cells isolated from glioblastoma and astrocytoma on expression of anti-apoptotic and multidrug resistance associated protein genes. *Neuroscience* 2008; 154:451-550.

Joo KM, Kim SY, Jin X, y cols. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastoma. *Lab Invest* 2008; 88:808-815.

Jung TY, Jung S, Moon KS, y cols. Changes of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma. *Oncol Rep* 2010, 23(5):1269-1276.

Kim KJ, Lee KH; Kim HS, y cols. The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathology* 2011, Jan 27, doi: 10.1111/j.1440-1789.2010.01194.x. (Epub ahead of print)

Kojima M, Ishii G, Atsumi N, y cols. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci* 2008; 99:1578–83.

Kong DS, Lee JI, Park K, y cols. Efficacy of stereotactic radiosurgery as a salvage treatment for recurrent malignant gliomas. *Cancer* 2008; 112:2046.

Kreth S, Thon N, Eigenbrog S, y cols. O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation. *PloS One* 2011; 18:e17156.

Kundson AG. Two genetics hits (more o less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:157-162.

Lacroix M, Abi-Said D. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001; 95: 190-8.

Leclerc X, HuismN t, Sorensen G. The potential of proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS) in the diagnosis and management of patients with brain tumors. *Cur Op Oncol*. 2002; 14(3):292-8.

Levin VA; Silva P, Hannigan J, y cols. Superiority of postradiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic glioma: NCOG 6G61 final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18:321.

Levin VA, Leibel SA, Gutin PH. Neoplasms of the central nervous system. En: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p 2100-2160.

Liu L, Gerson SL. Targeted Modulation of MGMT: Clinical Implications. *Clin Cancer Res* 2006; 12(2):328-331.

Liu L, Yuan X, Zeng Z, y cols. Análisis of gene expresión and chemoresistance of CD133+ cancer ítem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 5:67-78.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (eds) (2007). *WHO Classification of tumours of the central nervous system*. IARC, Lyon.

Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, y cols. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol* 1990; 8:1277-1280.

Maxwell JA, Johnson SP, Quinn JA, y cols. Quantitative analysis of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in malignant glioma. *Mol Cancer Ther* 2006 ; 5:2531–2539.

Medical Research Council Brain Tumor Working Party. Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial. *J Clin Oncol* 2001,19:509.

Metellus P, Coulibaly B, Nanni I, y cols. Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort. *Cancer* 2009; 115:4783-4794.

Metellus P, Nanni-Metellus I, Delfino C, y cols. Prognostic Impact of CD133 mRNA Expression in 48 Glioblastoma Patients Treated with Concomitant Radiochemotherapy: A Prospective Patient Cohort at a Single Institution. *Ann Surg Oncol* 2011. DOI 10.1245/s10434-011-1703-6.

Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W, y cols. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2006; 24(16):2563-9.

Nakagawa T, Ido K, Sakuma T, y cols. Prognostic significance of the immunohistochemical expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein-1 in glioblastomas. *Neuropathology* 2009; 29(4): 379-388.

Nakasu S, Fukami T, Baba K, y cols. Immunohistochemical study for O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the non-neoplastic and neoplastic components of gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 2004; 70:333-340.

Nakasu S, Fukami T, Jito J, y cols. Prognostic significance of loss of O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in supratentorial diffuse low-grade astrocytoma. *Surg Neurol* 2007; 68(6):603-608.

Neglia JP, Robison LL, Stovall M, y cols. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1528–1537.

O'Brien CA, Pollet A, Gallinger S, y cols. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110.

Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, y cols. Identification of A2B5+CD133-tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 2008; 62:505–514.

Ohgaki, H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 2005; 25: 1-7.

Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL, y cols. Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2008; 14(24):8205-8212.

Pallini R, Ricci-Vitiani L, Montano N, y cols. Expression of the Stem Cell Marker CD133 in Recurrent Glioblastoma and Its Value for prognosis. *Cancer* 2011; 117:162-174.

Park DM, Rich JN. Biology of glioma Cancer Stem Cells. *Mol. Cells* 2009; 28:7-12.

Parkinson JF, Wheeler HR, Clarkson A, y cols. Variation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *J Neurooncol* 2008; 87:71-78.

Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, y cols. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:4933-4938.

Perry JR, Rizek P, Cashman R, y cols. Temozolomide rechallenge in recurrent malignant glioma by using a continuous temozolomide schedule: the "rescue" approach. *Cancer* 2008; 113(8):2152-7.

Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, y cols. Anti-O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol* 2008; 18:520–532.

Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, y cols. Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol* 2009; 27(8):1262-1267.

Raymond E, Fabbro M, Boige V, y cols. Multicentre phase II study and pharmacokinetic analysis of irinotecan in chemotherapy-naive patients with glioblastoma. *Ann Oncol* 2003; 14(4):603-14.

Read TA, Fogarty MP, Markant SL, y cols. Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. *Cancer Cell* 2009; 15: 135–147.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, y cols. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115.

Rich JN, Reardon DA, Peery T, y cols. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2004; 22(1):133-42.

Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, y cols. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010; 12(2):116-121.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature Rev Genet* 2005; 6:597-610.

Rodriguez FJ, Thibodeau SN, Jenkins RB, y cols. MGMT immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008; 16:59–65.

Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA, y cols. DNA methylation: an epigenetic process of medical importance. *Rev Invest Clin* 2004; 56(1):56-71.

Rollison DE, Helzlsouer KJ, Alberg AJ, y cols. Serum antibodies to JC virus, BK virus, simian virus 40, and the risk of incident adult astrocytic brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12:460–463.

Ron E, Modan B, Boice JD, y cols. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N Engl J Med* 1988;319:1033–1039.

Ropolo M, Daga A, Griffiero F, y cols. Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. *Mol Cancer Res* 2009; 7(3):383-392.

Rood BR, Zhang H, Cogen PH, y cols. Intercellular heterogeneity of expression of the MGMT DNA repair gene in pediatric medulloblastoma. *Neuro-Oncology* 2004; 6:200-207.

Sadones J, Michotte A, Veld P, y cols. MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma. *Eur J Cancer* 2009; 45:146–153.

Salmaggi A, Bolardi A, Gelati M, y cols. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia* 2006; 54(8):850-860.

Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, y cols. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 2010; 126: 950–958.

Salozhin SV, Prokhorchuk EB, Georgiev GP. Methylation of DNA of the Major Epigenetic Markers. *Boichemistry* 2005; 70:525-532.

Scott CB, Scarantino C, Urtasun R, y cols. Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40(1):51-5.

Selker RG, Shapiro WR, Burger P, y cols. The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine. *Neurosurgery* 2002; 51:343.

Shah N, Lin B, Sibenaller Z, y cols. Comprehensive Analysis of MGMT Promoter Methylation: Correlation with MGMT Expression and Clinical Response in GBM. *PLoS One* 2011; 6(1): e16146.

Shaw RJ, Hall GL, lowe D, y cols. The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: correlation of quantitative methylation data with gene expression. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 2008 Mar;134(3):251-6.

Shibata S, Sadamori N, Mine M, y cols. Intracranial meningiomas among Nagasaki atomic bomb survivors. *Lancet* 1994; 344:1770.

Shintani T, Hayakawa N, Kamada N. High incidence of meningioma in survivors of Hiroshima [letter]. *Lancet* 1997; 349:1369.

Shrieve DC, Alexander E, Wen PY. Comparison of stereotactic radiosurgery and brachytherapy in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Neurosurgery*. 1995; 36(2):275-82.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, y cols. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res* 2003; 63:5821-5828.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, y cols. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432:396–401.

Simpson JR, Horton J, Scott C, y cols. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results os three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 26:239.

Sonoda Y, Yokosawa M, Saito R, y cols. O(6)-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expresión is correlatos with progresión-free survival in patients with glioblastoma. *Int J Clin Oncol* 2010; 15(4):352-358.

Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, y cols. Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60:853.

Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 2002; 359:1011.

Stupp R, Hegi M. Methylguanine methyltransferase testing in glioblastomas: when and how? *J Clin Oncol* 2007; 25:1459-1460.

Stupp R, Hegi M, Mason WP, y cols. 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: 459-466.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, y cols. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352:987.

Tanaka S, Kobayashi I, Utsuki S, y cols. O⁶-methylguanine-DNA methyltranspherase gene expression in gliomas by means of real-time quantitative RT-PCR and clinical response to nitrosoureas. *Int J Cancer* 2003; 103:67-72.

Tang K, Jin Q, Yan W, y cols, Clinical correlation of MGMT protein expression and promoter methylation in Chinese glioblastoma patients. *Med Oncol* 2011, Mar 11. (Epub ahead of print).

Thon N, Damianoff K, Hegermann J, y cols. Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas. *Mol Cell Neurosci* 2010; 43(1): 51-59.

Thon N, Eigenbrod S, Grasbon-Frodl EM, y cols. Predominant influence of MGMT methylation in non-resectable glioblastoma after radiotherapy plus temozolomide. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011 82(4): 441-446.

Trends in SEER incidence and U.S. mortality using the joinpoint regression program 1975-2000 with up to three joinpoints by race and sex. En: Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al.: *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000*. Bethesda, Md: National Cancer Institute, 2003., Section 3: Brain and Other Nervous System Cancer (Invasive), Table III.

Tsao MN, Mehta MP, Whelan TJ, y cols. The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63:47.

Uchida N, Buck DW, He D, y cols. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 14720–14725.

Ueda S, Mineta T, Nakahara Y, y cols. Induction of the DNA repair gene O6-methylguanine DNA methyltransferase by dexametasona in glioblastomas. *J Neurosurg* 2004; 101:659-663.

van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, y cols. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 2006; 24:2715.

van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, y cols. MGMT Promoter Methylation is Prognostic but Not Predictive for Outcome to Adjuvant PCV Chemotherapy in Anaplastia Oligodendroglial Tumors: A Report From EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol* 2009; 27(35):5881-5886.

van Niffterik KA, van den Berg J, van der Meide W, y cols. Absence of the MGMT protein as well as methylation of the *MGMT* promoter predict the sensitivity for temozolomide. *British Journal of Cancer* 2010; 103:29–35.

Verhaak R, Hoadley K, Purdom E, y cols. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; 17 : 98-110.

Vlassenbroeck I, Califice S, Diserens AC, y cols. Validation of real-time methylation-specific PCR to determine O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter methylation in glioma. *J. Mol. Diagn* 2008; 10:332–337.

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, y cols. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2007; 25(30):4722-4729.

Wager M, Menei P, Guilhot J, y cols. Prognostic molecular markers with no impact on decision-making: the paradox of gliomas based on a prospective study. *Br J Cancer* 2008; 98(11):1830-1838.

Walker MD, Alexander EJ, Hunt WE, y cols. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas: A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 1978; 49:333.

Ward RJ, Lee L, Graham K, y cols. Multipotent CD15 + cancer stem cells in patched-1- deficient mouse medulloblastoma. *Cancer Res* 2009; 69:4682–4690.

Watanabe T, Katayama Y, Komine C, y cols. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course. *Int. J. Cancer* 2005; 113:581-587.

Watanabe R, Nakasu Y, Tashiro H, y cols. O⁶-Methylguanine DNA methyltransferase expression in tumor cells predicts outcome of radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide therapy in patients with primary glioblastoma. *Brain Tumor Pathology* 2011; 28: 127-135.

Weller M, Felsberg J, Hartmann C, y cols. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009; 27:5743-5750.

Weller M, Stupp R, Reifenberger G, y cols. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat. Rev. Neurol* 2010; 6:39-51.

Westphal M, Hilt DC, Bortey E, y cols.: A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncol* 2003; 5:79.

Wick A, Felsberg J, Steinbach JP, y cols. Efficacy and tolerability of temozolomide in an alternating weekly regimen in patients with recurrent glioma. *J Clin Oncol* 2007; 25(22):3357-61.

Wick W, Hartmann C, Engel C, y cols. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristina or temozolomide. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5874-80.

Wick W, Stupp R, Beule AC, y cols. A novel tool to analyze MRI recurrence patterns in glioblastoma. *Neuro-Oncology* 2008; 10:1019-1024.

Wong S, Rosenthal MA, Dowling A, y cols. Phase II study of two-weekly temozolomide in patients with high-grade gliomas. *J Clin Neurosci* 2006; 13(1):18-22.

Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, y cols. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumour Group. *J Clin Oncol* 1999; 17:2762.

Yung WK, Albright RE, Olson J, y cols. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer* 2000; 83:588.

Zawlik I, Vaccarella S, Kita D, y cols. Promoter methylation and polymorphisms of the *MGMT* gene in glioblastomas: a population-based study. *Neuroepidemiology* 2009; 32:21–29.

Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, y cols. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14(1):123-129.

Zhang M, Song T, Yang L, y cols. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2008; 27:85-92.

Zhao Po, Yazhuo Li, Yali Lu, Y cols. Aberrant expression of CD133 protein correlates with Ki-67 expression and is a prognostic marker in gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer* 2010; 10:218-224.

Zheng C Q, Ji S P, Gong F, Li A M, Tai J L, and Zhang Y P. Detection of O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in chemotherapy for glioma. *Chinese Journal of Cancer*. 2009; 28:575-80.

