

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

“Expresión de MGMT y MMR en células tumorales de glioblastoma como indicadores de la respuesta al tratamiento con temozolamida”.

Memoria presentada por Dña. Gloria Perazzoli

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Granada, 17 de Marzo de 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Gloria Perazzoli
D.L.: GR 1931-2014
ISBN: 978-84-9083-102-1

El doctorando, **Gloria Perazzoli**, y los directores de la tesis, **José Carlos Prados Salazar**, **Consolación Melguizo Alonso** y **Raúl Ortiz Quesada**, Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

GRANADA A 13/03/2014

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: **José Carlos Prados Salazar**

Fdo.: **Gloria Perazzoli**

Fdo.: **Consolación Melguizo Alonso**

Fdo.: **Raúl Ortiz Quesada**

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 **GLORIA PERAZZOLI** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Expresión de MGMT y MMR en células tumorales de glioblastoma como indicadores de la respuesta al tratamiento con temozolamida”**.

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 17 de Marzo de 2014.

Fdo: Dr. D. Jose Carlos Prados Salazar

Catedrático de Universidad

Dra. CONSOLACIÓN MELGUIZO ALONSO,

CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO ANATOMÍA Y EMBRIOLGÍA HUMANADE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D^a **GLORIA PERAZZOLI** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Expresión de MGMT y MMR en células tumorales de glioblastoma como indicadores de la respuesta al tratamiento con temozolamida”**.

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 17 de Marzo de 2014.

Fdo: Dra. Dña. Consolación Melguizo Alonso

Catedrática de Universidad

Dr. RAUL ORTIZ QUESADA,

PROFESOR AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA
UNIVERSIDAD DE JAÉN.

HACE CONSTAR:

Que D^a **GLORIA PERAZZOLI** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Expresión de MGMT y MMR en células tumorales de glioblastoma como indicadores de la respuesta al tratamiento con temozolamida”**.

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 17 de Marzo de 2014.

Fdo: Dr. D. Raúl Ortiz Quesada

Profesor Ayudante Doctor

Indice

SUMMARY.....	19
RESUMEN	25
I. INTRODUCCIÓN	32
1. Generalidades Glioblastoma.....	32
1.1 Epidemiología.....	32
1.2 Clasificación.....	35
1.3 Manifestaciones clínicas	37
1.4 Diagnóstico.....	38
1.4.1. Tomografía computarizada (TC)	38
1.4.2. Resonancia magnética (RM).....	39
1.4.3. Otras técnicas	39
1.4.3.1. SPECT cerebral	40
1.4.3.2. Tomografía por Emisión de positrones (PET)	40
1.4.3.3. Espectroscopia por resonancia magnética (ERM).....	40
1.4.3.4. RM perfusión	41
1.4.3.5. RM difusión.....	41
1.4.4. Histológico	41
1.4.5. Diagnóstico de pseudo progresión	42
1.5 Factores pronóstico	42
1.5.1. Clínicos	43
1.5.2. Histológicos.....	44
1.5.3. Terapéuticos	44
1.5.4. Moleculares	45
1.6 Tratamiento.....	45
1.6.1. Cirugía.....	46
1.6.2. Radioterapia	47
1.6.3. Quimioterapia.....	49
1.6.3.1. Quimioterapia local: Carmustina	49
1.6.3.2. Quimioterápica sistémica: TMZ	49
2. Alteraciones genéticas.....	52
2.1. Alteraciones moleculares.....	54
2.1.1. Pérdida de heterocigosidad (LOH) del cromosoma 10	54
2.1.2. Aumento de factores.....	55
2.1.3. Pérdida alélica de los cromosomas 1p y 19q.....	55
2.2. Alteraciones envías de señalización	55
2.3. Alteraciones en vía EGFR/PTEN/Akt/mTOR	56
2.4. Alteraciones en vía TP53/MDM2/p14 ^{ARF}	57
2.5. Alteraciones en vía p16ink4/RB1/CDK4	58
3. Epigenética y metilación del DNA	60
3.1. Aspectos generales de la metilación.....	60
3.2. Efectos de la metilación	61
3.3. Regulación de la metilación	62
3.4. DNA metilasas	63

3.5.	Estudio de la metilación del DNA	64
4.	Epigenética y Cáncer	65
4.1.	Metilación aberrante	65
4.1.1.	Hipometilación global del genoma.	66
4.1.2.	Hipermetilación de las islas CpG de la región promotora.	66
5.	Mecanismos de resistencia	67
5.1.	MGMT	67
5.1.1.	Mecanismo de acción.....	67
5.1.2.	Respuesta de MGMT a los agentes alquilantes	69
5.1.3.	Regulación clínica de MGMT	72
5.2.	MMR	73
5.2.1.	Mecanismo de acción.....	73
5.2.2.	Respuesta de MGMT a los agentes alquilantes	75
5.3.	P- Glicoproteína	76
5.3.1.	Mecanismo de acción.....	77
6.	Células madre tumorales	78
6.1.1.	Identificación de las CSC.....	78
6.1.2.	Efecto de la radioterapia sobre las CSC.....	79
II.	OBJETIVOS.....	84
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	88
ESTUDIOS EN PACIENTES	88	
1.	Población de estudio	88
2.	Muestras de tejido cerebral tumoral.....	88
3.	Determinación del estado de metilación de MGMT	89
3.1	Desparafinación de las muestras.....	89
3.2	Digestión del tejido desparafinado.....	90
3.3	Eliminación de las interacciones ADN-paraformaldehído.....	90
3.4	Extracción de ADN del tejido desparafinado.....	90
4.	Modificación del DNA mediante Bisulfito Sódico.....	91
4.1	Pretratamiento del DNA con bisulfito sódico.....	91
4.2	Lavado del DNA.....	92
5.	PCR específica de metilación del promotor del gen MGMT (MSP)	93
ESTUDIOS A NIVEL CELULAR	94	
1.	Cultivos celulares.....	94
1.1	Líneas celulares.....	94
1.2	Cultivo de líneas celulares	94
1.3	Descongelación de las líneas celulares	94
1.4	Mantenimiento de las líneas celulares	95
1.5	Congelación de las líneas celulares.....	96
2.	Tratamiento de las líneas celulares	96
3.	Ensayo de proliferación celular	97
4.	Análisis del ciclo celular	98

5.	Análisis de proteínas mediante WESTERN BLOT	99
5.1	Obtención de proteínas.....	99
5.2	Cuantificación de proteínas.....	99
5.3	Preparación del gel SDS-PAGE	100
5.4	Preparación de las muestras	101
5.5	Electroforesis.....	101
5.6	Transferencia.....	101
5.7	Bloqueo e incubación con anticuerpos	102
5.8	Revelado.....	103
6.	Extracción de DNA de las líneas celulares.....	103
6.1	Cuantificación del DNA.....	104
6.2	Chequeo mediante electroforesis	104
7.	Modificación del DNA mediante Bisulfito Sódico.....	104
8.	PCR específica de metilación del promotor del gen MGMT (MSP)	104
9.	Análisis de alta resolución de la metilación de MGMT (HRM).....	105
10.	Extracción de RNA de las líneas celulares	106
10.1	Cuantificación del RNA.....	107
10.2	Chequeo mediante electroforesis	107
11.	Transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa.....	107
12.	PCR de expresión de MGMT.....	108
13.	Real Time PCR.....	109
14.	Estudio estadístico.....	110
VI.	RESULTADOS	113
	ESTUDIOS EN PACIENTES	113
1.	Características clínicas y anatómo-patológicas.....	113
2.	Análisis de la supervivencia global de los pacientes.....	114
3.	Análisis de la metilación del promotor de MGMT.....	117
	ESTUDIOS A NIVEL CELULAR	120
1.	Estudio de la IC ₅₀	120
1.1.	Concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) frente a la temozolamida.....	120
1.2.	Concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) tras la exposición a ciclos de temozolamida	121
2.	Estudio del ciclo celular	123
3.	Análisis de MGMT.....	126
3.1.	Metilación de MGMT en las líneas celulares basales	126
3.2.	Metilación de MGMT en las líneas celulares tras la exposición a los ciclos de TMZ	127
3.3.	Evolución de la expresión de la enzima MGMT durante la exposición a la TMZ	128
3.4.	Análisis de la implicación de MGMT como mecanismo de resistencia a TMZ de las líneas celulares de glioblastoma	133
3.4.1.	Determinación de la IC ₅₀ tras la sobreexpresión de MGMT con 5-Aza-2'-deoxicitidina.....	133

3.4.2.	Determinación de la IC ₅₀ tras la inhibición de MGMT con O6-Benzilguanina	136
4.	Análisis de MMR.....	138
4.1.	Análisis de la expresión basal de MMR en las líneas celulares y tras la exposición a TMZ	138
4.2.	Inhibición de MMR con cloruro de cadmio en las líneas celulares basales	140
4.2.1.	Determinación de la IC ₅₀ tras la inhibición de MMR con cloruro de cadmio	143
5.	Análisis de P-glicoproteína.....	144
5.1.	Análisis de la expresión basal P-glicoproteína en las líneas celulares y tras la exposición a TMZ.....	144
5.2.	Determinación de la IC ₅₀ tras la administración de verapamilo	146
6.	Análisis de CD133	147
6.1.	Variación de expresión de CD133 tras los sucesivos tratamientos con TMZ	147
V.	DISCUSIÓN	153
VI.	CONCLUSIONS	171
VI.	CONCLUSIONES	175
VII.	BIBLIOGRAFÍA	179

Summary

SUMMARY

Glioblastoma multiforme (GBM) represents the most aggressive glioma in the adult population and is a disease with rapid progression and median overall survival of less than one year. Surgery is the initial treatment and allows obtaining a histological diagnosis, increasing the effectiveness of subsequent chemoradiotherapy and increasing survival. In recent years radiotherapy with concurrent temozolomide followed by adjuvant temozolomide has become the standard treatment for these patients.

However, despite advances in surgical resection and chemotherapy and radiotherapy in the treatment response to treatment, the survival of these patients remains poor. The most recent research focuses on the existence of mechanisms of resistance to the treatment for these patients which is temozolomide. The most studied mechanism of resistance in these tumors is the repair protein O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase (MGMT). There are many studies in which the determination of MGMT gene protein promoter methylation is used as a predictor of survival and response to treatment with temozolomide, being accepted by the scientific community. This repair protein, repair DNA through the elimination of an alkyl group from the O6 atom of guanine in DNA of cells exposed to alkylating agents, like temozolomide. The regulation of the expression of this protein is based on an epigenetic silencing by promoter methylation. When the MGMT gene promoter is methylated, the gene is silenced and therefore there has not repair protein. In this case the lesion produced by the alkylating agent in the tumor cell by chemotherapy becomes irreversible and the cell undergoes apoptosis. This means that patients who have MGMT gene methylated have a better prognosis to temozolomide treatment as demonstrated by several studies like Stupp et al. (2009) in which increases the overall survival of patients with MGMT methylated from 12.2 months to 18.2 months. By contrast, others studies show the existence of patients despite having MGMT methylated have not improved survival after treatment with temozolomide. For this reason in recent years and increasingly are being proposed other mechanisms of TMZ resistance such as the DNA mismatch repair complex MMR, and the multidrug resistance protein P-glycoprotein.

The repair system errors MMR functions by introducing nicks in the DNA when it recognizes an erroneous base pairing starting a futile cycle of repair. This causes a signal to the apoptosis pathway. When this complex is mutated and thus non-functional or when there is a decrease in its expression, makes the cell more resistant to TMZ treatment because apoptosis does not occurs. Studies Cahill et al. (2007) and Flesberg et al., (2011) determined that the

reduced expression of MMR or the deletion of one of its subunits, in this case the MSH6, is present in recurrent glioblastomas being able to be the cause of tumor progression observed in these patients.

P-glycoprotein is a cytoplasmic membrane transporter protein which is known as well as MDR-1 (multidrug resistance 1). This protein has been widely studied in colon and breast cancer, and has been shown to be responsible for resistance to the drug of choice in these tumor types. This protein is able to eject the drug out of the cell in an ATP energy dependent mediated process and preventing its action. In the case of glial tumors, the presence of the P-glycoprotein in the luminal surface of the blood brain barrier is known, acting as a protector of any harmful or toxic substances to the system. Therefore, in this research we have also focused on the analysis of p-glycoprotein as a mechanism of resistance in glial tumors.

For the development of this dissertation began conducting a study on samples from 52 patients at the Hospital Virgen de las Nieves of Granada from intraoperative biopsies, in order to confirm the value of MGMT as prognostic marker for predicting survival and response to temozolamide treatment. The results of this study have allowed us to complete and validate the results previously published in J. Trans. Med (Melguizo et al., 2012) showing that of the 52 patients studied, 53.8% had MGMT promoter methylation versus 44.2% without methylation. Correlation of methylation status with the clinical history of patients, specifically with the survival rate, has allowed us to determine that there is a positive correlation between MGMT methylation status and survival of these patients, which increases by 15% in patients with MGMT methylation.

Despite the positive correlation between survival and MGMT promoter methylation in multiple studies has not been possible to explain the non-response to temozolamide treatment in patients with MGMT methylation is why we performed an *in vitro* study on different nervous system tumors cell lines to determine the involvement of other mechanisms of resistance to temozolamide.

The *in vitro* study in glioblastoma cell lines (SK-N-SH, SF268, LN229 and A172) subjected to the action of temozolamide has allowed us to differentiate between two types of behavior in this drug, lines that have high basal expression MGMT (SK-N-SH, SF268) and a high resistance to temozolamide and lines with no MGMT expression (LN229 and A172) which are relatively sensitive to temozolamide action. Analysis of the modulation of the expression of several DNA repair mechanisms, MGMT and MMR, after exposure of the two types of cell lines to temozolamide has shown that those cell lines which have a high basal expression of MGMT barely present expression of MMR studied gene complex and lines with low basal expression of MGMT have a high expression of MMR genes. Following temozolamide exposure in lines

with low MGMT basal expression (A172 and LN229) we found an increase in the level of MGMT expression and a decrease in MMR repair complex, suggesting the contribution of both mechanisms in increasing temozolomide resistance of these lines observed by increasing the value of IC_{50} for this drug.

In the case of lines with high MGMT basal expression (SF268 and SK-N-SH), the MGMT mRNA expression decreases after temozolomide administration cycles, which theoretically would result in lower drug resistance, like the expression of MMR complex resulting in increased drug resistance, Both mechanisms can be compensated by no modifying the IC_{50} values on these lines.

The variation of MGMT protein expression using demethylating agents, such as 5-Aza-2'-deoxycytidine, or compounds that block its action, such as O6-benzylguanine, allowed us to show that MGMT increase in cell which have an active MMR system causes an increase in resistance, while cells deficient in MMR systems, both modifications inhibition and over-expression, do not affect drug sensitivity.

The study of classic multidrug resistance mechanisms mediated by transporters, as MDR has allowed us to verify that low basal levels of p-gliocoproteína in cell lines and their increase upon exposure of the cell cultures to temozolomide are insufficient to influence resistance of these lines as verapamil blocking involves no change in the inhibitory dose 50 against temozolomide.

Finally, analysis of the expression of a marker of tumor stem cells of the nervous system such as CD133, which increases upon exposure to temozolomide cell cultures, may be responsible for conferring resistance to the cells and therefore the phenomena of recurrences in patients.

Resumen

RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GBM) representa el glioma más agresivo en la población adulta y es una enfermedad con una progresión rápida y una mediana de supervivencia global inferior a un año. La cirugía es el tratamiento inicial y permite obtener un diagnóstico histológico, aumentar la eficacia de la quimiorradioterapia posterior y aumentar la supervivencia. En los últimos años la radioterapia con temozolamida concurrente seguida de temozolamida adyuvante se ha convertido en el tratamiento estándar de estos pacientes.

Sin embargo, a pesar de los avances en las resecciones quirúrgicas y en el tratamiento quimioterápico y radioterápico la respuesta al tratamiento, la supervivencia de estos pacientes sigue siendo escasa. Las investigaciones más recientes se centran en la existencia de mecanismos de resistencia frente al tratamiento de elección de estos pacientes que es la temozolamida. El mecanismo de resistencia más estudiado en este tipo de tumores es la proteína reparadora metil-guanina-O6-DNA metiltransferasa (MGMT). Existen muchos estudios en los que la determinación de la metilación del promotor del gen de la proteína MGMT se utiliza como factor pronóstico de supervivencia y respuesta al tratamiento con temozolamida, siendo aceptado por la comunidad científica. Esta proteína de reparación, 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, como es la temozolamida. La regulación de la expresión de esta proteína se basa en un silenciamiento epigenético mediante metilación del promotor. Cuando el promotor del gen de MGMT se encuentra metilado, el gen se encuentra silenciado y por lo tanto no se produce proteína reparadora. En este caso la lesión que produce el agente alquilante en la célula tumoral mediante quimioterapia se convierte en irreversible y la célula entra en apoptosis. Esto implica que pacientes que presentan el gen MGMT metilado tengan un mejor pronóstico frente al tratamiento con temozolamida tal y como demuestran diversos estudios como los de Stupp y cols., (2009) en los que se incrementa la supervivencia global de los pacientes con MGMT metilado de 12,2 meses a 18,2 meses. Por el contrario, existen estudios que ponen de manifiesto la existencia de pacientes que a pesar de tener MGMT metilado no presentan mejoras en la supervivencia tras el tratamiento con temozolamida. Por esta razón en los últimos años y cada vez más se están proponiendo otros mecanismos de resistencia a la TMZ como son el complejo de reparación de errores en el DNA, MMR, y la proteína de resistencia a multidrogas P-glicoproteína.

El sistema de reparación de errores MMR funciona introduciendo mellas en el DNA cuando reconoce un apareamiento erróneo de bases mediante un ciclo fútil de reparación. Esto provoca una señal para el inicio de la apoptosis celular. Cuando este complejo esta mutado y por lo tanto no es funcional o cuando existe una disminución de la expresión del mismo, hace que la célula sea más resistente al tratamiento con TMZ ya que no se produce la apoptosis celular. Los estudios de Cahill y cols., (2007) y Flesberg y cols., (2011) determinan que la disminución de la expresión de MMR o la delección de una de sus subunidades, en este caso la MSH6, está presente en glioblastomas recurrentes pudiendo ser la causa de progresión tumoral observada en estos pacientes.

La P-glicoproteína es una proteína transportadora de la membrana citoplasmática, que se conoce con el nombre de MDR-1 (MultiDrug Resistance 1). Esta proteína ha sido muy estudiada en cáncer de colon y mama, y se ha visto que es responsable de la resistencia a los fármacos de elección en estos tipos tumorales, ya que es capaz de expulsar el fármaco fuera de la célula en un proceso dependiente de energía y mediado por ATP, evitando su actuación. En el caso de tumores gliales se conoce la presencia de la P-glicoproteína en la cara luminal de la barrera hematoencefálica, actuando como protector de cualquier sustancia tóxica o nociva para el sistema. Por ello, en este trabajo de investigación nos hemos centrado también en el análisis de p-glicoproteína como mecanismo de resistencia en tumores gliales.

Para el desarrollo de esta tesis doctoral comenzamos realizando un estudio sobre muestras de 52 pacientes del Hospital Virgen de las Nieves de Granada procedentes de biopsias intraoperatorias, con el objeto de confirmar el valor del marcador pronóstico MGMT como factor predictivo de supervivencia y repuesta al tratamiento con Temozolamida. Los resultados de este estudio nos han permitido completar y validar los resultados previamente publicados en J. Trans. Med. (Melguizo y cols., 2012) mostrando que de los 52 pacientes estudiados, un 53,8% presentaba metilación del promotor de MGMT frente a un 44,2% sin metilación. La correlación del estado de metilación con el historial clínico de los pacientes, concretamente con la tasa de supervivencia, nos ha permitido determinar que existe una correlación positiva entre el estado de metilación de MGMT y la supervivencia de estos pacientes, que incrementa en un 15% en los pacientes que presentan metilación en MGMT.

A pesar de la correlación positiva encontrada entre supervivencia y metilación del promotor de MGMT, en múltiples trabajos no ha sido posible explicar la no respuesta al tratamiento con temozolamida en pacientes que presentan metilación de MGMT, por ello hemos realizado un estudio *in vitro* en distintas líneas celulares de tumores de sistema nervioso de para determinar la implicación de otros mecanismos de resistencia a la temozolamida.

El estudio *in vitro* en líneas celulares de glioblastoma (SK-N-SH, SF268, LN229 y A172) sometidas a la acción de la temozolamida nos ha permitido diferenciar entre dos tipos de compartamiento frente a este fármaco, líneas que presentan una elevada expresión basal de MGMT (SK-N-SH, SF268) y una elevada resistencia a temozolamida y, líneas que al no expresar MGMT (LN229 y A172) son relativamente sensibles a la acción de temozolamida. El análisis de la modulación de la expresión de diferentes mecanismos de reparación del ADN, MGMT y MMR, tras la exposición de los dos tipos de líneas celulares a temozolamida ha demostrado que aquellas líneas celulares que tienen una alta expresión basal de MGMT apenas presentan expresión de los genes estudiados del complejo MMR y que aquellas líneas con baja expresión de MGMT basal presentan una alta expresión de los genes del MMR. Tras la exposición a temozolamida en las líneas con baja expresión basal de MGMT (A172 y LN229) encontramos un incremento en el nivel de expresión de MGMT y una disminución del complejo de reparación MMR, lo que indicaría la contribución de ambos mecanismos en el incremento de resistencia a temozolamida de estas líneas observado por el incremento del valor de IC_{50} para este fármaco.

En el caso de las líneas con alta expresión basal de MGMT (SF268 y SK-N-SH), la expresión del ARNm de MGMT disminuye tras la administración de los ciclos con temozolamida, lo que teóricamente provocaría una disminución de la resistencia al fármaco, de igual forma, la expresión del complejo MMR provocando un aumento de la resistencia al fármaco, pudiendo ambos mecanismos compensarse no modificando los valores de IC_{50} en estas líneas.

La variación de la expresión de la proteína MGMT mediante el uso de agentes desmetilantes, como la 5-Aza-2'-deoxicitidina, o compuestos que bloqueen su acción, como la O6-benzilguanina, nos permitió demostrar que el incremento del MGMT en células que presentan un sistema MMR activo, provoca un aumento de la resistencia, mientras que en células con sistemas MMR deficientes, las modificaciones tanto la inhibición como la sobre expresión, no afectan a la sensibilidad al fármaco.

El estudio de mecanismos clásicos de resistencia a multidrogas mediado por transportadores, como MDR nos ha permitido comprobar que los bajos niveles basales de p-glicoproteína en las líneas celulares y su incremento tras la exposición de los cultivos celulares a temozolamida son insuficientes para influir en la resistencia de estas líneas puesto que su bloqueo con verapamilo no implica modificación en la dosis inhibitoria 50 frente a la temozolamida.

Finalmente en análisis de la expresión de un marcador de células madre tumorales de sistema nervioso como es el CD133, que incrementa tras la exposición a temozolamida de los

cultivos celulares, puede ser el responsable de conferir resistencia a las células y por tanto de los fenómenos de recidivas en pacientes.

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades Glioblastoma

1.1 Epidemiología

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan el 2-3% del total de las neoplasias en el adulto. Estos tumores se clasifican en función del tipo celular del que proceden, representando los gliomas, tumores que se caracterizan por originarse en células gliales, el 60% de todos los tumores del sistema nervioso central (Jemal y cols., 2007). Dentro de los gliomas de alto grado se incluye el astrocitoma anaplásico (AA), el oligodendroglioma anaplásico (OA) y el glioblastoma multiforme (GBM) caracterizados por su alta capacidad de infiltrar el tejido cerebral adyacente. El glioblastoma multiforme, es el tumor cerebral primario más frecuente (54 %) (figura 1.1) y maligno de entre todas las neoplasias de la glía (Dolecek y cols., 2012) y será el objeto de este estudio.

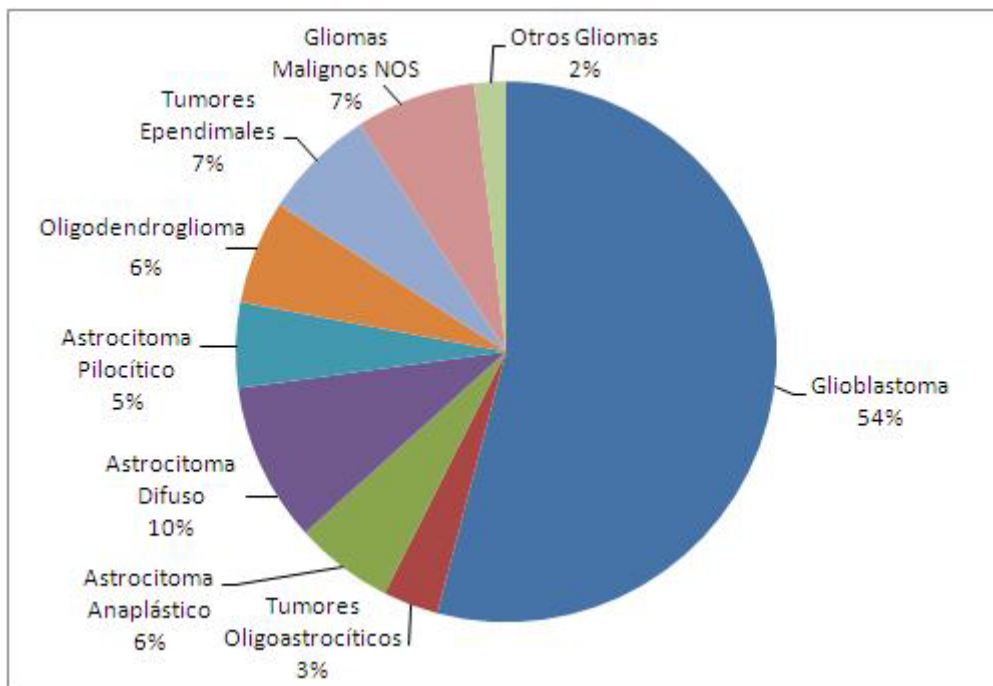


Figura. 1.1. Distribución de los tumores primarios de Cerebro y Gliomas del sistema nervioso central por subtipos histológicos (N=90,828). Figura obtenida de Dolecek y cols., 2012 (CBTRUS 2008)

Para conocer los datos referentes a la incidencia de los tumores cerebrales existen diferentes registros, siendo el más actualizado y detallado el de Estados Unidos: Central Brain Tumor Registry of the United States – CBTRUS, que recoge datos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades, del Programa Nacional de Registro del Cáncer y del Instituto Nacional del Cáncer. Según el último informe, que corresponde al periodo 2005-2009 (CBTRUS (Dolecek y cols., 2012)), la incidencia de tumores primarios y malignos del SNC fue de 20,59 casos/100.000 habitantes-año. Esta tasa se divide en 5,13 casos/100.000 habitantes-año para niños entre 0-19 años y 26,81 casos/100.000 habitantes-año para adultos mayores de 20 años (CBTRUS). En el caso del glioblastoma, la tasa de incidencia es de 3,19 casos /100.000 habitantes-año, siendo mayor la incidencia en hombres (3,98) que en mujeres (2,53).

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.

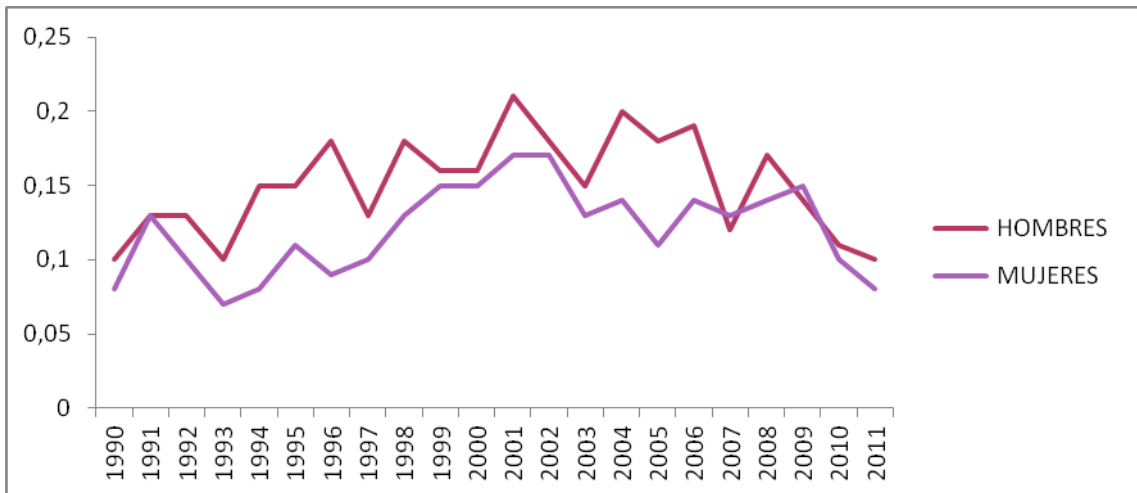


Figura 1.2. Tasa de incidencia de tumores cerebrales en España (Centro Nacional de Epidemiología ISCIH)

La tasa de supervivencia de los pacientes con glioblastoma es muy baja, de 9 a 12 meses desde el momento en el que se diagnostica (de la Fuente y cols., 2007). Aunque en algunos casos, como el de los gliomas de bajo grado, la supervivencia puede ser de varios años después del diagnóstico, solo un 3% de los pacientes con glioblastoma multiforme sobrevive 5 años tras el mismo (Ohgaki y cols., 2005). La baja supervivencia es consecuencia de ciertos factores de riesgo que incrementan la agresividad del tumor y por tanto afectan a la supervivencia global del paciente.

Entre estos factores de riesgo se ha demostrado que existe un incremento en el riesgo de padecer un tumor cerebral según la ocupación del paciente, especialmente aquellas relacionadas con la industria (Wrensch y cols., 2002). Esto lleva a pensar que este tipo de tumor se da con mayor frecuencia en países más desarrollados y por lo tanto con un nivel económico superior. Las radiaciones ionizantes están consideradas también como un factor de riesgo y existen estudios que demuestran que la exposición a rayos X incrementa el riesgo de padecer un tumor cerebral, siendo más acusado en niños (Neglia y cols., 2006). Existen estudios en los que se relaciona el riesgo de padecer tumor cerebral con la exposición a

radiación no ionizante como la provocada por el uso del teléfono móvil, aunque actualmente no está demostrada su relación (Hardell y cols., 2006).

1.2 Clasificación

La organización mundial de la salud (OMS) es la encargada de la clasificación de los tumores del SNC. La primera clasificación, se publicó por primera vez en 1979 basándose en un sistema de combinación del tipo de tumor y del nivel de malignidad de este. Esta clasificación es muy compleja ya que existen multitud de tipos celulares diferentes que pueden dar lugar a procesos tumorales. La actual clasificación de grados de la OMS para este tipo de tumores, está vigente desde 2007 establece una escala a para determinar la malignidad según las características histológicas del tumor (Louis y cols., 2007). Esta clasificación divide los tumores del SNC en cuatro grados de malignidad (figura 1.2)

Las características que posee cada grado y que lo diferencia de otro son las siguientes:

Grado I: los tumores englobados en este grado son considerados de evolución lenta siendo lesiones de bajo potencial proliferativo y por tanto de buen pronóstico. Incluye lesiones que se pueden curar con la resección quirúrgica.

Grado II: este grupo de tumores también es considerado de evolución lenta, con un crecimiento lento pero sus límites son imprecisos y difusos, considerando sus lesiones infiltrantes. Estos tumores son recurrentes tras la resección quirúrgica ya que la imprecisión de sus límites impide con frecuencia la extirpación quirúrgica completa y tienden a progresar a gliomas anaplásicos de grado III o glioblastomas secundarios de grado IV.

Grado III: los tumores de grado III se consideran de alto grado y se caracterizan por un crecimiento rápido, una capacidad de infiltración claramente expresada y anaplasia.

Gado IV: este grupo también se considera de alto grado ya que incluye lesiones que presentan un crecimiento rápido, presentan una anaplasia muy pronunciada, tienen tendencia a la necrosis y, en general, están asociadas con evolución prequirúrgica y posquirúrgica rápida de la enfermedad. Todo esto deriva en una alta mortalidad.

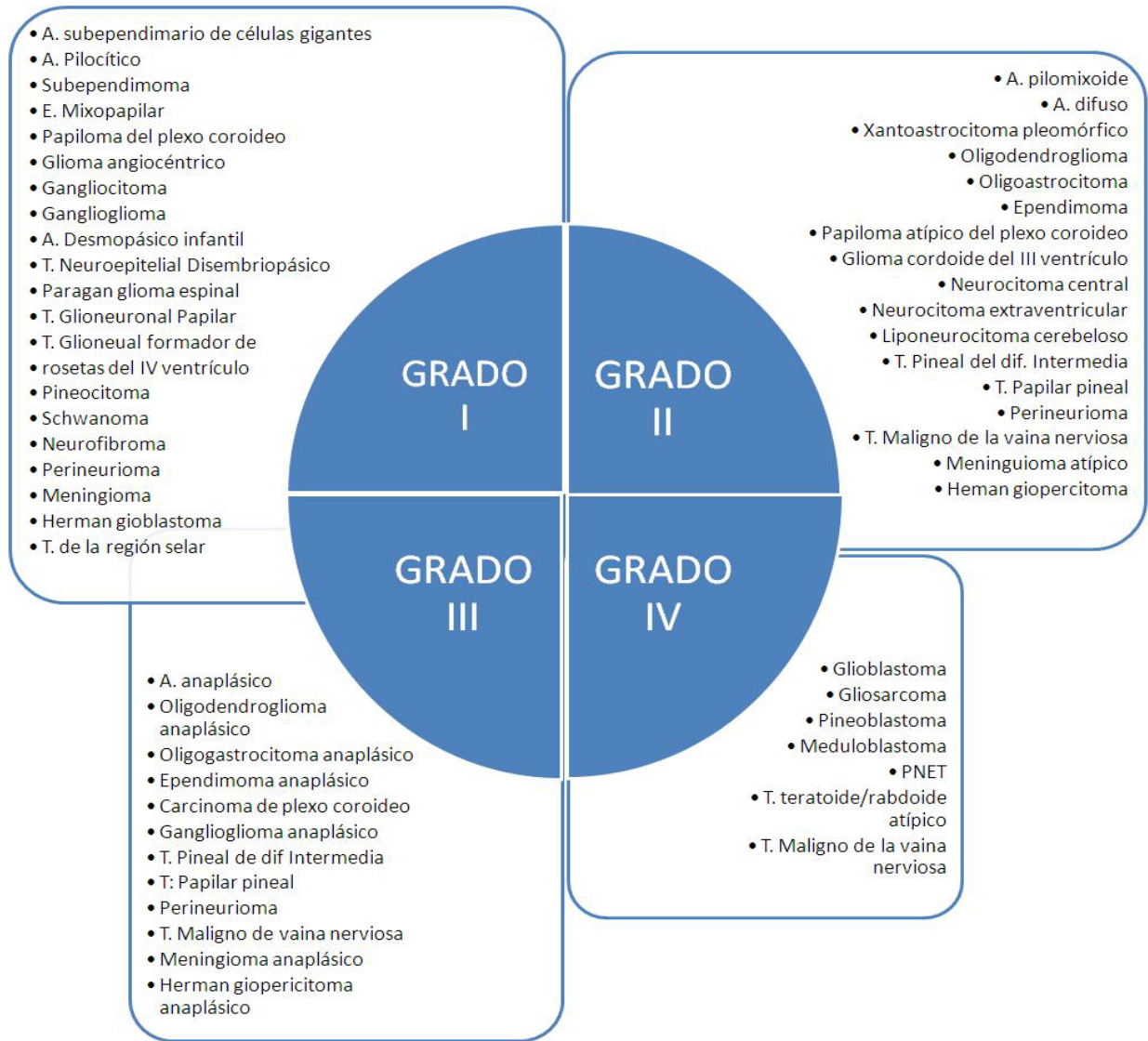


Figura 1.2. Clasificación de los tumores del sistema nervioso central de la OMS (Louis y cols., 2007)

El Glioblastoma multiforme (GBM), en el que se centra nuestro estudio es un glioma astrocítico grado IV de la OMS de comportamiento altamente agresivo. Puede ser primarios, originándose en pacientes de edad avanzada, y caracterizados por la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR) o secundarios, afectando en este caso a pacientes jóvenes por la transformación de un astrocitoma difuso o anaplásico, en este caso su principal característica es la mutación de P53.

1.3 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de los pacientes con tumores cerebrales son variadas. Van asociadas al grado de malignidad, es decir, una rápida evolución de los síntomas está asociada a un mayor grado de malignidad y por el contrario, una larga evolución está asociada a tumores menos malignos. Estos síntomas se pueden dividir en dos grupos: aquellos causados por un aumento de la presión intracraneal y aquellos causados por la localización del tumor (Bordignon y cols., 2006). El 75% de los pacientes con oligodendroglias y el 65% de los pacientes con gliomas presentan crisis comiciales, siendo esta la segunda manifestación clínica más frecuente en el momento del diagnóstico.

Dentro del primer grupo, aquellos causados por un aumento de la presión intracraneal, se encuentran las cefaleas que es el síntoma inicial y más común en más del 50% de todos los pacientes con glioma cerebral. Además dentro de este grupo se encuentran otros síntomas como pérdida de agudeza visual, náuseas, vómitos y rigidez de la nuca (de la Fuente y cols., 2007). A medida que estos se agravan los pacientes pueden presentar papiledema y hasta un 40% tienen disminución del nivel de conciencia.

Los síntomas del segundo grupo, causados por la localización del tumor, se producen en mayor medida por la destrucción e irritación del parénquima cerebral. Los síntomas estarán asociados al área afectada, por ejemplo, la pérdida de memoria, alteración conductual y apatía

mental indican lesiones en la zona frontotemporal, déficits neurológicos significativos indican que la lesión está localizada en el lóbulo temporal o en el cortex motor.

1.4 Diagnóstico

El diagnóstico inicial de glioblastoma se basa en pruebas de imagen radiológicas, los estudios mediante tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética nuclear (RMN) son complementarios y fundamentales para el diagnóstico de esta patología. El papel principal de estas técnicas de imagen es determinar la localización y extensión de la lesión, y su relación con las estructuras adyacentes. Además del uso de estas técnicas es necesario para el diagnóstico definitivo un estudio histológico (Jawahar y cols., 2003).

Otras técnicas menos utilizadas pero que también pueden aportar una información valiosa en el diagnóstico de esta patología son la espectroscopia por resonancia magnética (ERM), la perfusión, la difusión, el SPECT cerebral o el PET que comentaremos brevemente.

1.4.1. Tomografía computarizada (TC)

El estudio del tumor con esta técnica permite valorar la densidad de la lesión con respecto al parénquima cerebral normal circundante. Además, con la administración de contraste se pueden medir cambios de densidad para facilitar el diagnóstico diferencial entre ciertos tipos de tumores, lesiones infecciosas y/o patología cerebrovascular además de caracterizar la imagen tomográfica.

Esta técnica además, permite saber si hay presencia de calcificaciones en el tumor, hemorragias agudas y cambios óseos relacionados con el tumor. Estos datos son indicativos del tipo de crecimiento tumoral y por lo tanto del grado de malignidad del mismo.

1.4.2. Resonancia magnética (RM)

Hoy en día, la resonancia magnética es la técnica de elección para el diagnóstico de tumores cerebrales y en concreto de los gliomas ya que no es un tipo de radiación ionizante, posibilita la reconstrucción multiplanar, tiene una gran resolución de contraste, y evita la aparición de artificios de estructuras óseas de la base de cráneo. Se basa en la resonancia magnética de los núcleos de hidrógeno y de otros núcleos diferentes al hidrógeno, cuando están dentro de un campo magnético (Hernán y cols., 2004).

Las imágenes que genera son útiles en la distinción de detalles anatómicos, en la diferenciación entre sustancia gris y sustancia blanca (imágenes en T1) y tienen una elevada sensibilidad al incremento en la cantidad de agua presente en los tejidos, principalmente en el espacio extracelular (imágenes en T2).

En el caso de los glioblastomas, generalmente presentan áreas de diferente histología, mostrando una gran heterogeneidad. Presentan áreas de necrosis (característica) y hemorragias y un efecto masa muy llamativo. Otras diferencias en la intensidad de la señal son debidas a la vascularización, permeabilidad vascular y oxigenación.

1.4.3. Otras técnicas

Además de estas dos técnicas principales existen otras como la espectroscopia por resonancia magnética (ERM), la perfusión, la difusión, la tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT) cerebral o el PET que comentaremos brevemente.

1.4.3.1. SPECT cerebral

Se engloba dentro de las técnicas de neuroimagen funcionales junto con la PET, ya que permiten la obtención de imágenes funcionales cerebrales. Esta técnica se utiliza cuando la RM o TC no son definitivas, como por ejemplo en la diferenciación entre una recidiva y una radionecrosis tumoral, además de para determinar la malignidad del tumor (Fraile y cols., 1994).

1.4.3.2. Tomografía por Emisión de positrones (PET)

La tomografía por emisión de positrones (PET) es otra técnica funcional que permite el estudio del metabolismo tumoral. A diferencia de la SPECT es de utilidad en la evaluación de respuesta al tratamiento y seguimiento del tumor aunque hoy en día la disposición de los equipos necesarios para llegar a cabo esta técnica es aún minoritaria.

1.4.3.3. Espectroscopia por resonancia magnética (ERM)

La espectroscopia por resonancia magnética (ERM), no es específica para distinguir el grado de malignidad tumoral pero si tiene una gran sensibilidad para diferenciar el parénquima encefálico normal de las lesiones neoplásicas (Castillo y cols., 1996). Mediante esta técnica se registran las señales de los metabolitos del tejido cerebral permitiendo así el estudio del metabolismo cerebral in vivo. Esta cualidad hace que se utilice principalmente para monitorizar la respuesta a la radioterapia y quimioterapia.

1.4.3.4. RM perfusión

La resonancia magnética de perfusión tiene una resolución espacial y temporal muy superior al SPECT y al PET. Gracias a ella se pueden obtener mapas de volumen sanguíneo regional de todo el cerebro lo que permite diferenciar entre un glioma de alto grado y uno de bajo grado. Esto la hace una técnica importante dentro del estudio de los gliomas.

1.4.3.5. RM difusión

Esta técnica que tiene en cuenta la diferente movilidad de las moléculas, es importante en los gliomas para diferenciar un tumor necrótico de un absceso. Esto se consigue gracias a que esta técnica proporciona un cociente de difusión aparente (ADC). La reducción de este cociente es un indicativo de mayor agresividad del tumor.

1.4.4. Histológico

Antes de iniciar un tratamiento de una lesión intracraneal es obligado realizar un estudio histológico del tumor ya que las técnicas de imagen no pueden establecer un diagnóstico fiable. El estudio histológico se realiza mediante el uso de técnicas poco invasivas como son la búsqueda de marcadores tumorales o células malignas en el líquido cefalorraquídeo (de la Fuente y cols., 2007), aunque en los casos donde es posible es conveniente obtener una muestra de tejido tumoral.

1.4.5. Diagnóstico de pseudo progresión

En la mayoría de los pacientes con glioblastoma se ha observado que tras el tratamiento inicial, sufren una recaída con un incremento del tamaño del tumor no resecado quirúrgicamente o con la aparición de nuevas lesiones tumorales. Estos casos han sido considerados como progresiones clínicas y tratados con fármacos de segunda línea o con tratamiento paliativos, incluso aquellos pacientes que han experimentado un empeoramiento clínico y en ocasiones radiológico reversible.

La pseudo progresión, que ocurre en el 30% de los pacientes, 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).

1.5 Factores pronóstico

Se define como factor pronóstico toda medida obtenida del paciente a lo largo del tiempo, que tiene correlación con la probabilidad de recuperación o la probabilidad de recurrencia y por lo tanto con la supervivencia del paciente.

Estos factores pronóstico son propios de cada tumor y la información que reflejan es la base para poder efectuar un manejo óptimo del paciente y un tratamiento adecuado a cada caso (Louis y cols., 2007). Hasta el momento no se dispone de un modelo predictivo y pronóstico que sea lo suficientemente específico y sensible frente a los gliomas debido a sus características genéticas, biomoleculares e histopatológicas sumados a la variabilidad clínica que presentan (Ramirez y cols., 2010). Para el estudio de los factores pronósticos han sido divididos en varias categorías: factores clínicos que hacen referencia al paciente, histológicos que hacen referencia al tumor, terapéuticos que hacen referencia al tratamiento y moleculares que hacen referencia a alteraciones moleculares propias de los gliomas.

1.5.1. Clínicos

Mayoritariamente se definen dos variables clínicas como factores pronóstico, la edad y el estado funcional según la escala de Karnofsky (KPS). En el caso de la edad, pacientes diagnosticados con más de 60 años tienen un peor pronóstico que aquellos que son diagnosticados con menos de 40 (Buckner y cols., 2003).

La escala de KPS, cuyos valores oscilan entre 0 y 100, mide la capacidad de los pacientes con cáncer a la hora de realizar tareas rutinarias. (Tabla 1.3). Por lo tanto, pacientes con un índice de KSP igual o superior a 70 tienen un mejor pronóstico, mientras que pacientes con una puntuación de 50 o inferior indica elevado riesgo de muerte durante los 6 meses siguientes (Karnofsky, 1948).

100	Normal, asintomático, sin indicios de enfermedad
90	Capaz de realizar vida normal, pero con signos y síntomas leves de enfermedad
80	Actividad normal con esfuerzo, con algunos signos y síntomas de enfermedad
70	Capaz de cuidarse, pero incapaz de llevar a término actividades normales o trabajo activo
60	Requiere atención ocasional, pero puede cuidar de sí mismo
50	Requiere gran atención, incluso tipo médico. Encamado menos del 50% del día
40	Inválido, incapacitado, necesita cuidados y atenciones especiales. Encamado más del 50% del día
30	Inválido grave, severamente incapacitado, tratamiento de soporte activo
20	Encamado por completo, paciente muy grave, necesita hospitalización y tratamiento activo
10	Moribundo
0	Fallecido

Tabla 1.3. Escala de Karnofsky (Karnofsky 1948).

1.5.2. Histológicos

Los gliomas son tumores muy heterogéneos desde el punto de vista histológico y molecular, por lo que resulta muy importante obtener una buena clasificación de los mismos para utilizar el tratamiento óptimo en cada caso.

El grado de anaplasia constituye el parámetro histológico más decisivo en la supervivencia de pacientes con glioma. Los indicadores histológicos de anaplasia de los gliomas malignos son: la atipia nuclear, el número de mitosis, la proliferación vascular y la presencia de necrosis (Daumas-Duport y cols., 1988). Con estos indicadores se pueden hacer varias clasificaciones, como son las de la OMS y la de St. Anne/Mayo. Todas estas se pueden resumir en una única tabla (tabla 1.4)

Grado OMS	OMS	St. Anne	Criterios de Daumas-Duport
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 1.4 Equivalencia entre la clasificación de la OMS y la de St. Anne.

1.5.3. Terapéuticos

El grado de resección quirúrgica se establece como factor pronóstico (Buckner y cols., 2003) ya que la cirugía tiene un papel fundamental en el manejo clínico de los pacientes con tumores cerebrales. Una resección completa o casi completa de la tumoración da lugar a un mejor pronóstico obteniéndose una supervivencia de 11,3 meses con una resección completa frente a 10,4 meses si es parcial o 6,6 meses si solo se practica una biopsia (Simpson y cols.,

1993). Existen otros estudios (Walker y cols., 1978) que demuestran que un tratamiento con radioterapia postoperatoria también incrementa la supervivencia de los pacientes tras el mismo.

1.5.4. Moleculares

En conjunto con los parámetros clínicos clásicos, se pueden definir también parámetros genéticos/moleculares como factores pronóstico (Riley y cols., 2009). Éstos han de ser definidos en un análisis conjunto con las variables clásicas como son la edad, el grado histológico o la puntuación en la escala de Karnofsky. Entre estos factores hay estudios que identifican como tal la pérdida de heterocigosidad de 1p19q (LOH1p19q). Este es un factor pronóstico de supervivencia global y predictivo de respuesta al tratamiento quimioterápico en tumores oligodendrogiales (Burger y cols., 2001; McDonald y cols., 2005). Otros estudios han identificado a factores de crecimiento y sus receptores como posibles factores pronóstico en gliomas, como es el caso de EGFR5. Pero sin duda uno de los factores pronósticos moleculares más estudiados es la metilación del promotor del gen MGMT (Esteller y cols., 2000; Hegi y cols., 2004/2005) que será tratado más adelante.

1.6 Tratamiento

El tratamiento de los gliomas depende de la localización del tumor, la edad del paciente y el grado de Karnofski ya que los glioblastomas son tumores difusos, que se infiltran en el parénquima circundante (de la Fuente y cols., 2007). Por ello, su tratamiento es multidisciplinar y está basado en la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.

1.6.1. Cirugía

Para el tratamiento con cirugía es indispensable el uso de técnicas que permitan precisar al máximo tanto la localización como el tamaño del tumor. La estereotaxia (sistema de localización del tumor mediante un sistema geométrico para localizar el punto más adecuado para la biopsia), los sistemas de navegación (instrumentos informáticos que fusionan las imágenes radiológicas durante la intervención para una mejor localización del tumor), la microcirugía o 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) son algunas de las técnicas usadas para este fin.

La finalidad de la cirugía es por un lado obtener una muestra para el diagnóstico histológico, y por otro lado reducir la masa tumoral. Gracias a la cirugía se obtiene una reducción inmediata de la presión intracraneal lo que permite una mejor acción de los tratamientos posteriores como son la radioterapia y la quimioterapia siendo estos tratamientos ineficaces si no están precedidos de una reducción de la masa y de la presión intracraneal. Esto hace que la cirugía sea clave para el tratamiento de los gliomas.

En cuanto al volumen tumoral que se extrae en la cirugía, hay estudios que demuestran que a mayor resección del tumor aumenta significativamente la supervivencia comparado con resecciones menores (Lacroix y cols., 2001). En el estudio de Lacroix y cols. (2001) se comparan resecciones del 98% con resecciones menores observando una supervivencia de 8.8 meses en resecciones menores al 98% y de 13 meses en resecciones del 98%. Estos datos coinciden con estudios en los que se demuestra una mayor respuesta al tratamiento en pacientes sometidos a resecciones completas (Gorlia y cols., 2008; Stupp y cols., 2007). Esta mejora al tratamiento podría estar sustentada por estudios como el de Salzman y cols., 1996 en el que se analizan los cambios que se producen en el parénquima cerebral tras la resección. Cambios en el metabolismo y en el flujo sanguíneo, así como una

facilitación de la apertura de la barrera hematoencefálica que podría permitir una mejora en la penetración de los agentes quimioterápicos, pueden considerarse una ventaja para incrementar la eficacia del posterior tratamiento al que se someten los pacientes tras la cirugía.

La reintervención quirúrgica es una situación frecuente en pacientes que ya han sido sometidos a una primera cirugía. Esto se debe a las recidivas o progresiones de los tumores gliales tras el tratamiento son muy frecuentes en este tipo de tumores, en dichos pacientes se consideran como factores pronósticos relacionados con el beneficio de la reintervención el estado general del paciente, el volumen de la enfermedad residual, el grado histológico, el intervalo libre de recaída y el tipo de recurrencia. El valor de la reintervención ha sido sugerido en un análisis realizado por Yung y cols., (1999) en 168 pacientes con glioblastoma multiforme recurrente; los pacientes reintervenidos tuvieron una mayor supervivencia a un año (71% Vs. 15%), y a los dos años (32% Vs. 5%).

1.6.2. Radioterapia

La radioterapia es una técnica que permite inducir la muerte de las células mediante el uso de partículas ionizadas de alta energía que provocan daños en el material genético de la célula. Debido a esto, es muy importante realizar una planificación del tratamiento ya que la radioterapia puede dañar al tejido neurovascular que rodea al tumor.

Los estudios de Walker y colaboradores 1978, indican que el tratamiento con radioterapia adyuvante a la cirugía provoca un incremento de la mediana de la supervivencia de 14 a 36 semanas cuando se compara con un tratamiento de soporte, carmustina (BCNU), radioterapia y radioterapia más carmustina después de una cirugía del tumor. Gracias a estudios como este la radioterapia se convirtió en tratamiento estándar.

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. Algunas de estas técnicas son la radioterapia externa convencional, la radioterapia externa estereotáxica (radiocirugía) o la radioterapia intersticial o braquiterapia, entre otras.

La radioterapia externa convencional consiste en una irradiación externa del volumen tumoral intentando minimizar la cantidad de tejido sano circundante irradiado, y con ello, la toxicidad. Comienza a las 2-4 semanas tras la cirugía con una dosis óptima de 60Gy (Bleehen y cols., 1991). El tratamiento es administrado, según la dosis a alcanzar, durante varios días o semanas, recibiendo dosis diarias iguales.

En el caso de la radioterapia externa estereotáxica o radiocirugía es el tratamiento de elección en pacientes con gliomas de alto grado y recaídas poco voluminosas (Shrieve y cols., 1995) y consiste en una irradiación externa en la que el volumen de irradiación es pequeño.

La radioterapia intersticial o braquiterapia es extremadamente compleja y consiste en la implantación dentro del tejido tumoral de catéteres que son fuentes de irradiación evitando así la irradiación de tejido sano (Selker y cols., 2002).

El problema del tratamiento con radioterapia son los efectos secundarios. Estos efectos secundarios pueden ser clasificados según el momento de su aparición. Los efectos secundarios agudos son aquellos que se dan horas o días después al tratamiento y suelen ser cefaleas o empeoramiento de los déficits neurológicos que pueden ser tratados con corticoides. El segundo grupo de efectos secundarios son las toxicidades diferidas tempranas. Estas pueden aparecer desde la sexta semana posterior al tratamiento hasta seis meses después. A este grupo pertenecen los daños neurológicos reversibles que pueden tratarse también con corticoides. Por último las toxicidades tardías aparecen años después de finalizar la radioterapia y se producen por destrucción del tejido cerebral (radionecrosis).

1.6.3. Quimioterapia

La quimioterapia se incorporó como tratamiento estándar en los gliomas a partir de los resultados obtenidos por Stewart 2002 y Fine 1993, en los que demuestran un aumento de la supervivencia media tras la utilización de quimioterapia adyuvante. El objetivo principal de este tratamiento es aumentar la eficacia y disminuir los efectos secundarios. Para ello hay diversos métodos de administración de la quimioterapia.

1.6.3.1. Quimioterapia local: Carmustina

Los quimioterápicos más utilizados son los fármacos alquilantes como la carmustina (BCNU). Esta se administra de forma local mediante un polímero biodegradable en la cavidad quirúrgica durante la operación de resección. Existen estudios que demuestran un aumento en la supervivencia en pacientes tratados con cirugía + BCNU + RT, frente a aquellos tratados con cirugía + placebo + RT (Westphal y cols., 2003), causa por la que la FDA aprobó en Febrero de 2003 los implantes de BCNU en gliomas malignos como tratamiento inicial.

Este tratamiento está contraindicado en caso de infección intracerebral activa, edema cerebral importante, lecho quirúrgico hemorrágico y en tumores profundos o irreseccables o multifocales o bilaterales o situados en áreas elocuentes

1.6.3.2. Quimioterapia sistémica: TMZ

Una condición necesaria de las diferentes modalidades terapéuticas es la de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Además debe alcanzar una concentración eficaz en el tumor y, a dosis terapéuticas, minimizar la toxicidad sistémica.

La barrera hematoencefálica es la responsable de mantener la homeostasis del cerebro, permitiendo el paso selectivo a través de ella de nutrientes y de oxígeno que llegan al cerebro a través de la sangre. Sin embargo, esta función de barrera representa un obstáculo para la distribución de fármacos en el sistema nervioso central (Wong y cols., 2013).

La Temozolamida es un agente alquilante de segunda generación, de administración oral con un 100% de biodisponibilidad por esta vía en un tiempo máximo de 90 minutos (Marchesi y cols., 2007). Además tiene un rápido aclaramiento plasmático, que reduce así la posibilidad de efectos sistémicos. En cuanto a su penetración a través de la BHE, Meikle y cols., en 1998 realizaron un estudio mediante PET en pacientes con glioma de alto grado. En él se marcaba la TMZ con ^{11}C y se comprobaba como esta TMZ marcada se acumulaba más en tejido tumoral que en tejido normal, poniendo de manifiesto que la TMZ era capaz de penetrar en el parénquima cerebral. En cuanto a la preferencia de la TMZ por tejido tumoral puede ser explicable debido al pH de los mismos. La TMZ es muy estable al pH ácido del estómago aunque una vez en contacto con el pH básico de la sangre y de los tejidos, espontáneamente, se hidroliza dando lugar al metabolito activo MTIC (monometil triazeboimidazol carboxamida). Este no penetra bien en el cerebro, así que rápidamente se rompe para formar el ión reactivo metildiazonio (Koukourakis y cols., 2009). El pH del tejido tumoral es más alto en comparación con el tejido cerebral circundante, por lo que esta activación dependiente de pH quizá pueda dar lugar a una terapia dirigida (Saleem y cols., 2003).

El mecanismo de acción de la Temozolamida 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.

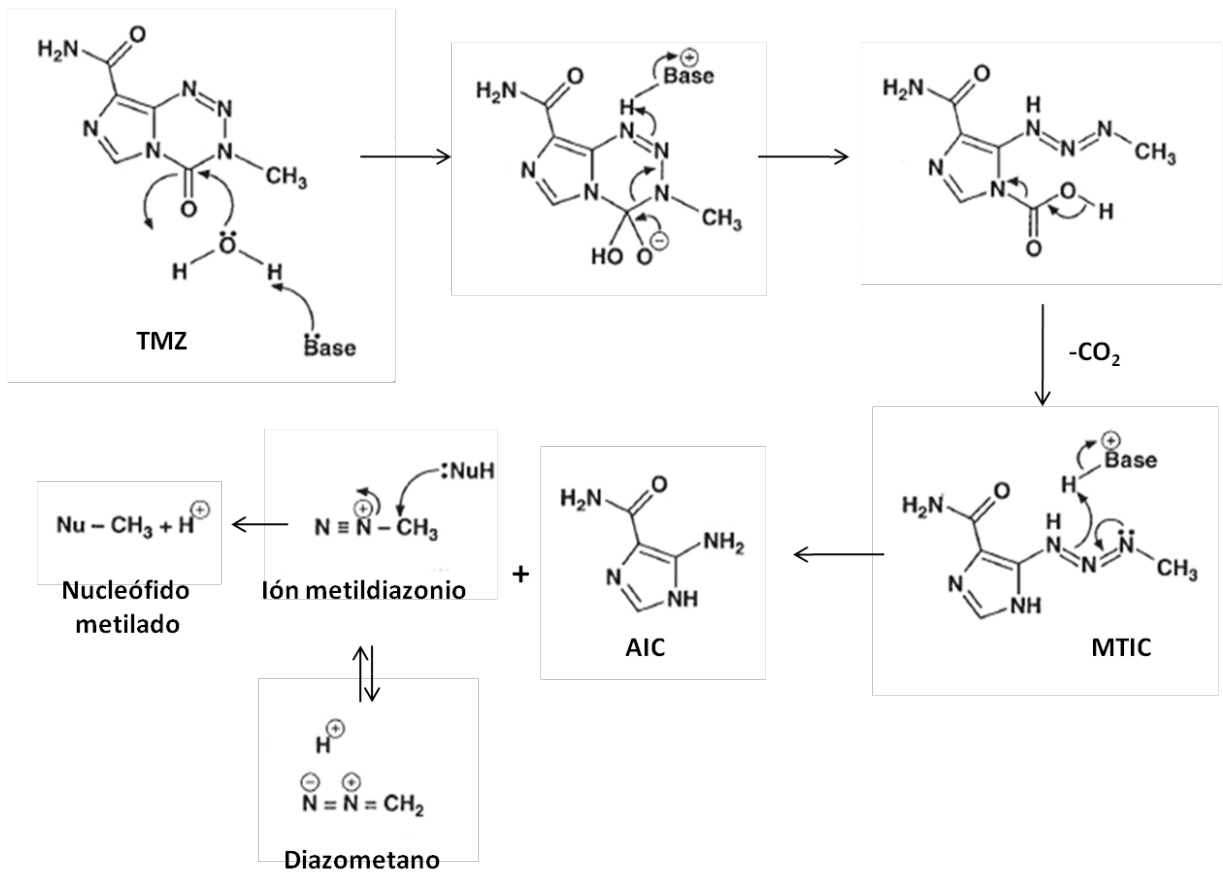


Fig. 1.5. Metabolismo de la TMZ a su forma activa. Modificado de Koukourakis y cols., 2009.

En ensayos de la EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) se muestra el uso de la temozolamida (TMZ) como adyuvante de la radioterapia, incrementando la media de supervivencia frente a la radioterapia sola (Stupp y cols., 2009). Las dosis orales de temozolamida usadas para el tratamiento, se muestran en la tabla 1.6, tanto para casos de nuevo diagnóstico, como para casos recurrentes.

Nuevo diagnóstico	
Con radiación concurrente	75 mg/m ² día x 42 días
Mantenimiento seguido de radiación	Ciclo 1: 150 mg/m ² día x 5 días
	Ciclo 2 al 6: 200 mg/m ² día x 5 días cada 28 días
Enfermedad recurrente	
Sin quimioterapia anterior	200 mg/m ² día x 5 días cada 28 días
Con quimioterapia previa	150mg/m ² día x 5 días cada 28 días
Procedimientos alternativos	50-175 mg/m ² día x 7 días cada 14 días
	75 mg/m ² día x 21 días cada 28 días
	200 mg/m ² x 1 dosis seguido de 90-100 mg/m ² cada 12 horas x 9 dosis cada 28 días

Tabla 1.6. Dosis orales de TMZ. Modificado de Villano y cols., 2009.

2. 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 1.7).

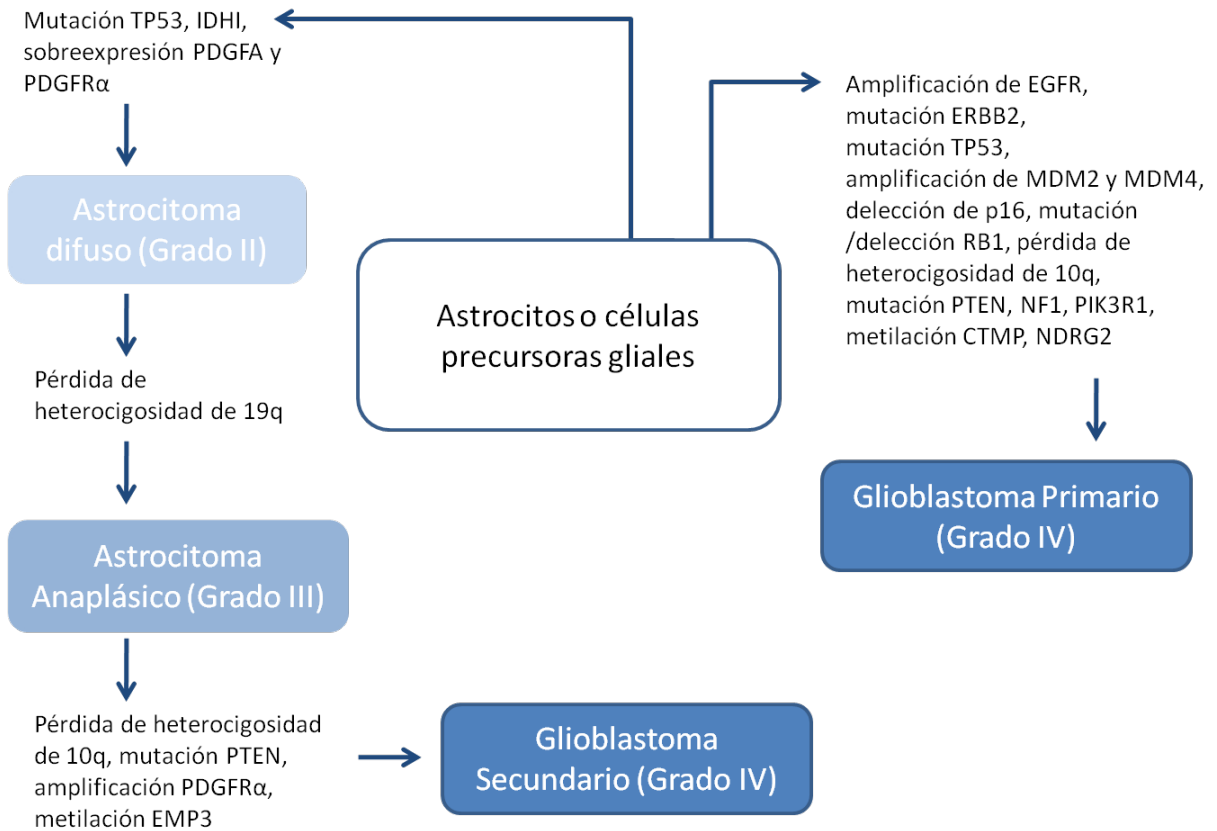


Figura 1.7. Esquema de los diferentes mecanismos y alteraciones moleculares más frecuentes implicadas en la génesis de un glioblastoma. Modificado de Riemenschneider y Reifenberger, 2009

Estas alteraciones sufridas por la célula tumoral pueden dividirse en dos grupos, aquellas alteraciones producidas en las vías de señalización y aquellas alteraciones producidas en las vías de reparación del DNA.

2.1. Alteraciones moleculares

2.1.1. Pérdida de heterocigosidad (LOH) del cromosoma 10

Con una frecuencia de más del 63% de los casos, la alteración más frecuente identificada en glioblastomas es la pérdida de heterocigosidad (LOH) en 10q. En este cromosoma se han identificado varios genes supresores de tumores (Ohgaki y cols., 2005):

- PTEN (homólogo de la tensina y fosfatasa) en 10q23.3. Mutaciones en PTEN se han detectado en el 20-40% de los glioblastomas, predominando en los primarios (de novo) y raramente en secundarios. Lo más frecuente es la pérdida de expresión de este gen en vez de mutaciones en el mismo, lo que sugiere que su regulación está basada en mecanismos de metilación (Baeza y cols., 2003).
- DMBT1 (supresor de tumores cerebrales malignos) localizado en 10q25.3-q26.1. Las mutaciones de este gen son poco frecuentes, debido a ello, la pérdida de su función es principalmente provocada por una delección en homocigosis (Franco-Hernández y cols., 2007). Esta alteración ya se observa en astrocitomas de bajo grado. La pérdida de función de DMBT1 podría estar sujeta a la metilación en su promotor pero todavía no existen suficientes trabajos que permitan afirmarlo.
- FGFR2 (receptor del factor del crecimiento fibroblástico) localizado en la región 10q26. Los últimos estudios indican que podría actuar como un gen supresor de tumores, aunque todavía se desconoce su función en la génesis de los gliomas (Franco-Hernández y cols., 2007).

2.1.2. Aumento de factores

La vascularización en los tumores cerebrales es muy alta por lo que necesita mantener una constante angiogénesis. Se ha visto que en estos tumores se encuentran sobreexpresados en mayor medida dos receptores de factores angiogénicos. Estos son el VEGFR-1 y el VEGFR-3, lo que provoca que su ligando el VEGF inducido a su vez a través de HIF-1, se una en mayor medida y promueva la angiogénesis del tejido.

Otro factor del que se ha visto una coexpresión anómala en tejido tumoral es el PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas y su receptor, PDGFR.

2.1.3. Pérdida alélica de los cromosomas 1p y 19q

La pérdida alélica de los cromosomas 1p y 19q tiene una incidencia de entre un 40-80% en los oligodendrogliomas. De estos, en un 60-70% de los casos aparece de forma combinada, teniendo este último caso mejor pronóstico y mejor respuesta a la quimioterapia y radioterapia. Estos datos hacen pensar que pueda ser un factor pronóstico importante en los oligodendrogliomas.

2.2. Alteraciones en vías de señalización

Las alteraciones genéticas en los GBM se dan frecuentemente en 3 vías de señalización celular. Alteraciones en el ADN y en el número de copias se producen en las siguientes rutas de señalización:

1. Activación de la vía de tirosín kinasas (EGFR/PTEN/Akt/mTOR)
2. Inactivación de p53 (TP53/MDM2/p14ARF)
3. Inactivación de la vía de retinoblastoma (p16ink4/RB1/CDK432)

2.3. Alteraciones en vía EGFR/PTEN/Akt/mTOR

La estimulación de la proliferación celular y la diferenciación celular de células normales y malignas, viene estimulada por la unión de los factores de crecimiento a sus correspondientes ligandos. Uno de estos es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que se localiza en el cromosoma 7p12 (Van Meir y cols., 2010) y requiere del factor de crecimiento epidérmico (EGF) como ligando específico para activarse.

La alteración de este receptor se da mayoritariamente en glioblastomas primarios viéndose amplificado en un 40% o sobreexpresado en un 60%, mientras que en glioblastomas secundarios solo ocurre en un 10% de los casos (Arjona y cols., 2006). Esta sobreexpresión génica puede deberse a una amplificación en tándem del gen que da como resultado un receptor que no requiere de ligando específico para activarse. Esta alteración provoca como resultado final una división celular descontrolada.

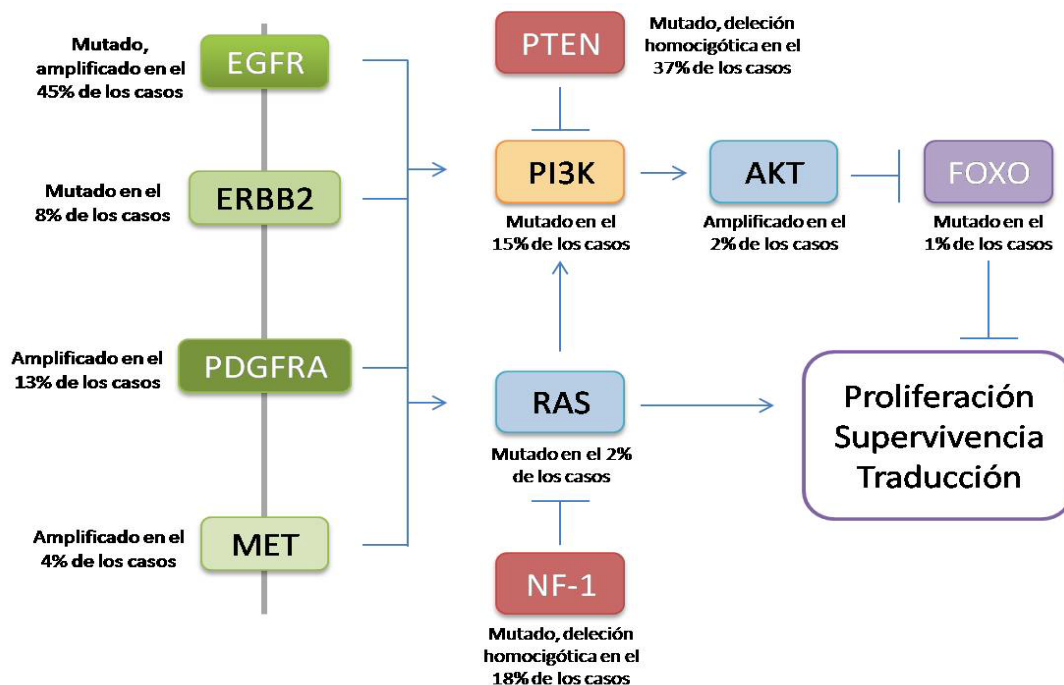


Figura 1.8. Representación de la vía de activación de las tirosín kinasas (ruta RTK/RAS/PI-3K/EGFR/PTEN/Akt/mTOR) alterada en el 88% de los casos En rojo se representa la pérdida de función Modificado de Van Meir y cols., 2010

2.4. Alteraciones en vía TP53/MDM2/p14^{ARF}

Esta vía está implicada en procesos de respuesta a estrés celular que provocan la activación de genes relacionados con el control del ciclo celular, reparación de DNA y apoptosis. Mutaciones en TP53 aparecen mayoritariamente en glioblastomas secundarios (65%) mientras que aparecen en menos del 10% de los glioblastomas primarios.

El gen TP53 codifica la proteína p53. Esta proteína es un factor de transcripción cuya función es unirse a los promotores de genes implicados en el control del ciclo celular, la reparación de DNA y la apoptosis entre otros. p53 normalmente se encuentra unido a MDM2, cuya función es reprimir su actividad. Esto hace que p53 no actúe bajo condiciones celulares normales hasta que entra en división, en fase G1-S que es cuando MDM2 libera a p53. Otro caso de liberación de p53 es si aparece daño en el DNA. En este caso tras su liberación, si p53 no se encuentra dañado, promueve la transcripción de genes implicados en la reparación del DNA o apoptosis según el daño producido sea reparable o no (Ohgaki y cols., 2005). En el caso de que p53 se encuentre dañado, es decir, si existen mutaciones en él, se produce un aumento de la división celular y una disminución de la apoptosis y de la reparación del DNA (Watanabe y cols., 1997).

A su vez, la proteína MDM2 está reprimida cuando no se encuentra unida a p53, por otra proteína conocida como CDKN2A o p14^{arf} (Figura 1.8). Esto implica que si esta proteína no funciona correctamente, se desencadenará un exceso de MDM2, lo que a su vez desencadenará un secuestro excesivo de p53. Esta mayor represión de p53 haría que se acumularan más daños en el DNA. La alteración de la proteína CDKN2A o p14^{arf} tiene lugar en el 76% de los casos de glioblastoma (Van Meiry cols., 2010).

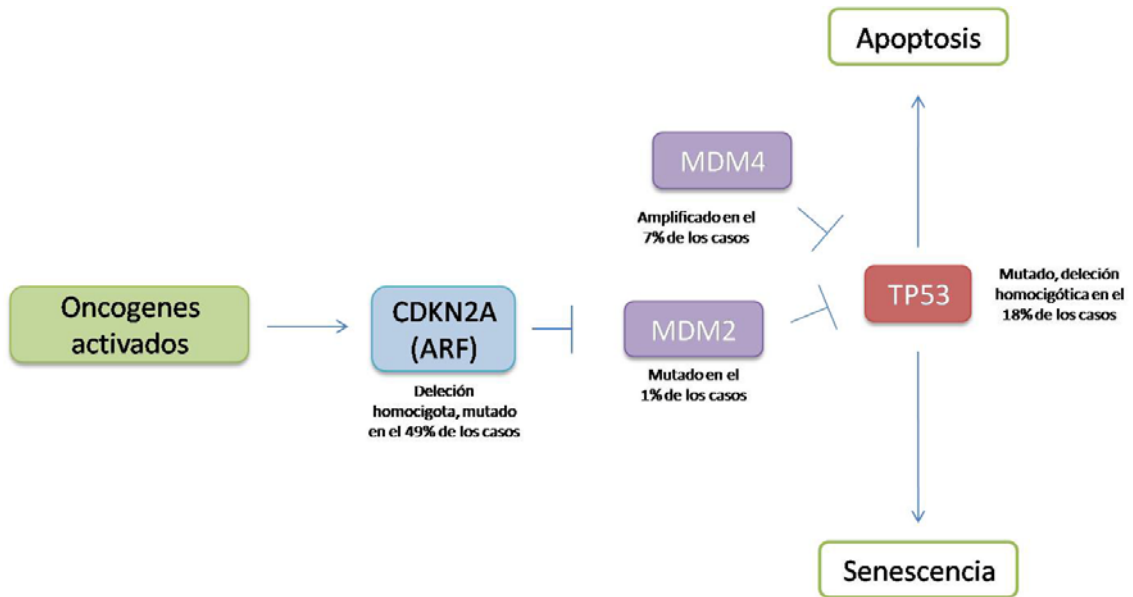


Figura 1.8. Representación de la vía de inactivación de p53, alterada en el 87% de los casos. En morado se representa la pérdida de función Modificado de Van Meir y cols., 2010

2.5. Alteraciones en vía p16ink4/RB1/CDK4

Rb1, el gen del retinoblastoma, se encuentra en el cromosoma 13q14.2 y codifica para una proteína que controla la transición G1-S del ciclo celular. Esta proteína normalmente se encuentra unida a la proteína E2F. Cuando Rb1 se fosforila libera a E2F permitiendo que esta active genes implicados en la transición G1-S del ciclo celular.

La alteración de esta vía se produce cuando Rb1 está continuamente fosforilada y no pueda unirse a E2F lo que da lugar a una división celular no controlada. Esta alteración se encuentra presente en el 77% de los casos de glioblastoma y se debe a la pérdida en homocigosis de CDKN24 o p16ink4, y/o la amplificación de CDK4. La ciclina CDKN24 o p16ink4 es la encargada de inhibir a la ciclina CDK4 y esta a su vez es la que fosforila a Rb1 para que libere a E2F (Van Meir y cols., 2010) (Figura 1.9). Esta liberación incontrolada de E2F también puede ser debida a la inactivación de Rb1 mediante la metilación de su promotor, todo ello

provoca que no se exprese y por lo tanto que aumente la concentración de E2F promoviendo de este modo la división celular (Nakamura y cols., 2001).

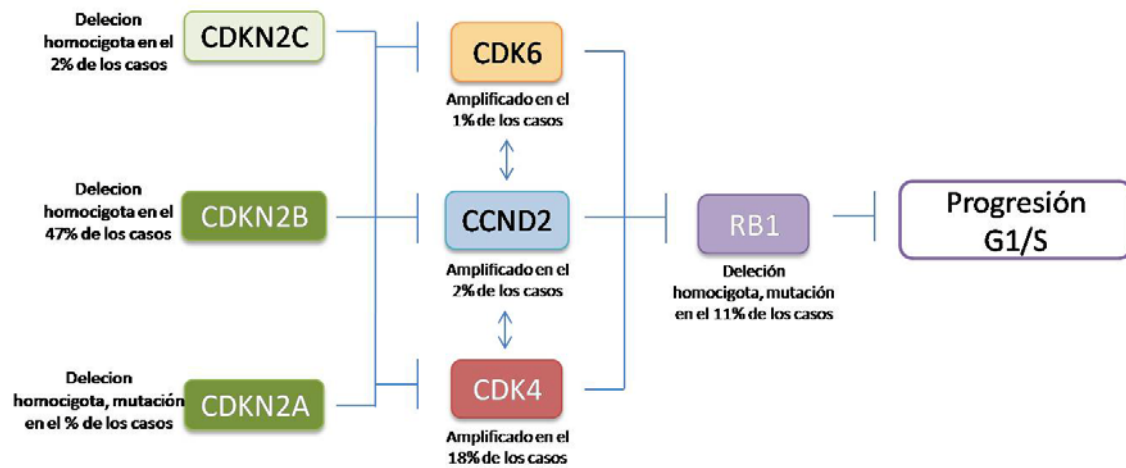


Figura 1.9. Representación de la vía de inactivación de RB1, alterada en el 77% de los casos. En verde se representa la pérdida de función Modificado de Van Meir y cols., 2010

3. Epigenética y metilación del DNA

Hay varias causas posibles que justifican la falta de expresión génica, entre ellas, además de las mutaciones puntuales o deleciones, se encuentran los cambios epigenéticos en el DNA. La epigenética estudia cambios que alteran el patrón de expresión genética sin alterar su secuencia nucleotídica (Baylin y cols., 2000). Estas modificaciones epigenéticas intervienen en procesos tan importantes como: el desarrollo embrionario, el destino celular, la inestabilidad genómica y el cáncer.

Los principales mecanismos de regulación epigenética son: las modificaciones de las colas de las histonas (código histónico), la remodelación de la estructura de la cromatina y la metilación del DNA. Esta última se produce en la región promotora de sus genes, donde se inicia el proceso de transcripción tras la unión con la RNA polimerasa (Baylin y cols., 2000).

3.1. Aspectos generales de la metilación

Durante la embriogénesis se establecen los patrones de metilación ya que el proceso es básico para el desarrollo normal de las células, aunque existen estudios que demuestran que hay un equilibrio entre metilación/desmetilación en cada ciclo celular (Reik y cols., 2001).

La metilación del DNA más frecuente tanto en eucariotas como en procariotas, es la adición covalente del grupo metilo en el carbono 5' del anillo de citosina, transformándose en 5'metil-citosina (5mC). Este mecanismo se encuentra muy conservado a lo largo de la evolución (Wu y Santi, 1987) y consiste en la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM) al carbono 5 del anillo pirimidínico de la citosina, mediante las DNA metiltransferasas (DNMTasas).

En mamíferos, esta modificación postranscripcional ocurre principalmente en dinucleótidos CpG, es decir, en aquellas citosinas que preceden a una guanina en la secuencia de DNA pero no todas las CpG del genoma se metilan en la embriogénesis. Por ejemplo, aquellas regiones de baja expresión génica tienen un mayor porcentaje de metilación mientras que aquellas con elevada expresión génica no se encuentran metiladas (Yoder y cols., 1997). En el promotor de aproximadamente el 40% de los genes se observan regiones con más de 500pb con un porcentaje de G+C mayor al 55% denominadas islas CpG. Si estas regiones se encuentran metiladas se produce el silenciamiento de esos genes asociando así la metilación al silenciamiento génico (Cardoso y cols., 1999, Esteller y cols., 2002).

3.2. Efectos de la metilación

Existen dos posibles mecanismos por los cuales puede interferir la metilación en la transcripción. Dichos mecanismos se resumen en la siguiente tabla 1.10.

Nivel transcripcional	Bloquea la unión del factor de transcripción
	Inhibe al promotor indirectamente
	Remodela la estructura de la cromátida
	Dificulta la elongación de la transcripción
Nivel de cromatina	Impide la unión de factores

Tabla 1.10. Efectos de la metilación aberrante del ADN

A nivel transcripcional el resultado de la metilación de las islas CpG del promotor se traduce en la inhibición del gen. Esto puede llevarse a cabo mediante diferentes mecanismos: bloqueando la unión del factor de transcripción; inhibiendo la actividad del promotor indirectamente mediante la unión de factores que reconocen citosinas metiladas lo que provoca que los factores de transcripción no puedan unirse (figura 1.11); mediante la

remodelación de la cromatina con complejos como MeCP1, MBD1, MBD2 y MBD3; reduciendo la accesibilidad de la RNA polimerasa lo que dificulta la elongación de la transcripción (Klosey cols., 2006).

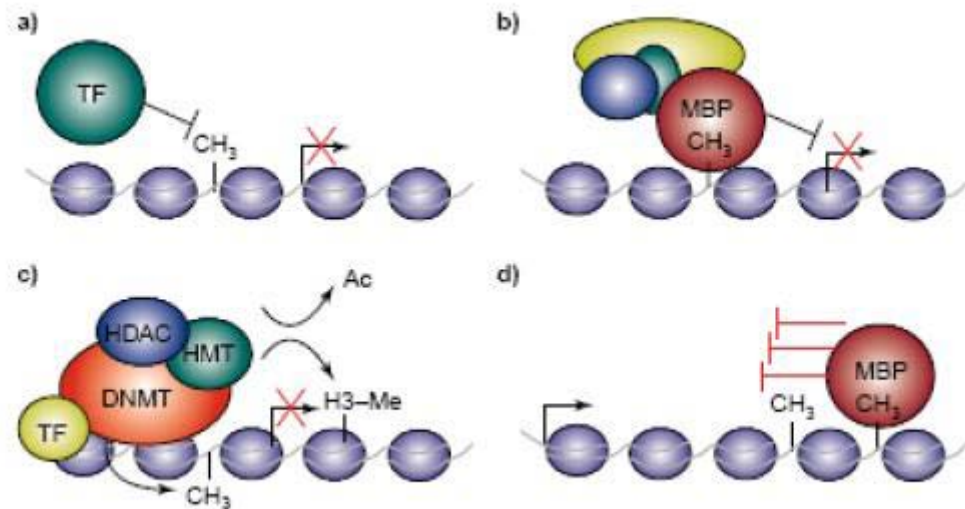


Figura 1.11: Mecanismos de inhibición de la transcripción por metilación del DNA

A nivel de cromatina el resultado es la correcta estructura y estabilidad del centrómero. Si la cromatina se encuentra muy metilada puede dar lugar a inestabilidad del centrómero e inmunodeficiencias entre otras.

3.3. Regulación de la metilación

El patrón de metilación de un individuo va variando a lo largo de su vida, modificándose a lo largo de los ciclos de división. En el momento del nacimiento se tiene gran parte del DNA no metilado y tras las sucesivas divisiones, con la edad, se va adquiriendo dicha metilación a lo largo de todo el genoma. Tras la fecundación se establecen patrones de metilación nuevos para cada individuo eliminando los heredados para prevenir a la

descendencia de mutaciones heredadas. Esta fase se denomina metilación de novo, ya que se crea un patrón nueva. Existe una metilación de mantenimiento en la que se regenera el patrón de metilación preestablecido en la división anterior (Goll y cols., 2005).

3.4. DNA metilasas

Las enzimas encargadas de la transferencia del grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM) al carbono 5 del anillo pirimidínico de la citosina son las DNA metiltransferasas (DNMTasas). Estas DNMTasas se clasifican en cinco familias según la función que realizan (Colot y cols., 1999) (Tabla 1.12).

DNMT1	Metilación de mantenimiento: metila preferentemente secuencias hemimetiladas
DNMT2	Función no conocida
DNMT3	Encargadas de la metilación de novo: metilan secuencias no metiladas y hemimetiladas
Masc	Específicas de hongos
Cromometilasas	Específicas de plantas

Tabla 1.12 . Clasificación de las DNA metiltransferasas

En mamíferos se han descrito como DNMTasas responsables de la metilación la DNMT1, DNMT3a y DNMT3b (Bestor y cols., 2000). La primera de ellas sería responsable de la metilación de mantenimiento y las dos últimas de la metilación de novo.

Las DNMT1 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). Las ADN metiltransferasas con

actividad de Novo son, DNMT3A y DNMT3B (Rodríguez y cols., 2004). Estas se encargan de adicionar grupos metilo a las islas CpG al ADN no metilado anteriormente.

Por último, encontramos la DNMT3L que sin tener actividad metiltransferasa se expresa únicamente en células germinales y es imprescindible para el imprinting materno y la proespermatogonia (Buryanov y cols., 2005).

3.5. Estudio de la metilación del DNA

Existen numerosas técnicas que nos permiten realizar un estudio de la metilación del DNA. Las más utilizadas son aquellas que utilizan la técnica del bisulfito sódico para obtener un patrón de metilación (Shapiro y cols., 1970). Gracias a la alta eficacia y sensibilidad de esta técnica, se desarrollaron otras derivadas de esta que se aplican según el objetivo que se quiera conseguir (Tabla 1.13). Dentro de ellas, la más utilizada es la PCR específica de metilación (MSP) (Herman y cols., 1996) que permite el análisis de muestras incluidas en parafina con una gran sensibilidad.

Análisis de metilación del DNA	Contenido global	HPLC	
		Hibridación in situ	
		Ensayos enzimáticos	
	CpG de secuencias específicas	Sin bisulfito	Endonucleasas de restricción
		Con bisulfito	PCR
			MSP

Tabla 1.13. Técnicas de análisis de la metilación del ADN

4. Epigenética y Cáncer

Las células tumorales escapan a la regulación normal de las células, caracterizándose por una división descontrolada y por tanto un crecimiento sin control. Se piensa que la mutación que desencadena este comportamiento anómalo y su posterior transformación en célula tumoral, se localiza en la célula progenitora o stem cell (Sell y cols., 2006). El estudio epigenético de estas células tumorales puede dar una respuesta a mecanismos tales como la adquisición de resistencia a fármacos, la inactivación de genes supresores de tumores o la activación de oncogenes (Bird y cols., 2002).

4.1. Metilación aberrante

La metilación es la alteración epigenética más estudiada en células tumorales. Estas células sufren una importante alteración en el patrón de metilación que puede englobarse en dos grupos de estudio, una hipometilación global del genoma y una hipermetilación de las islas CpG de la región promotora (Figura 1.14).

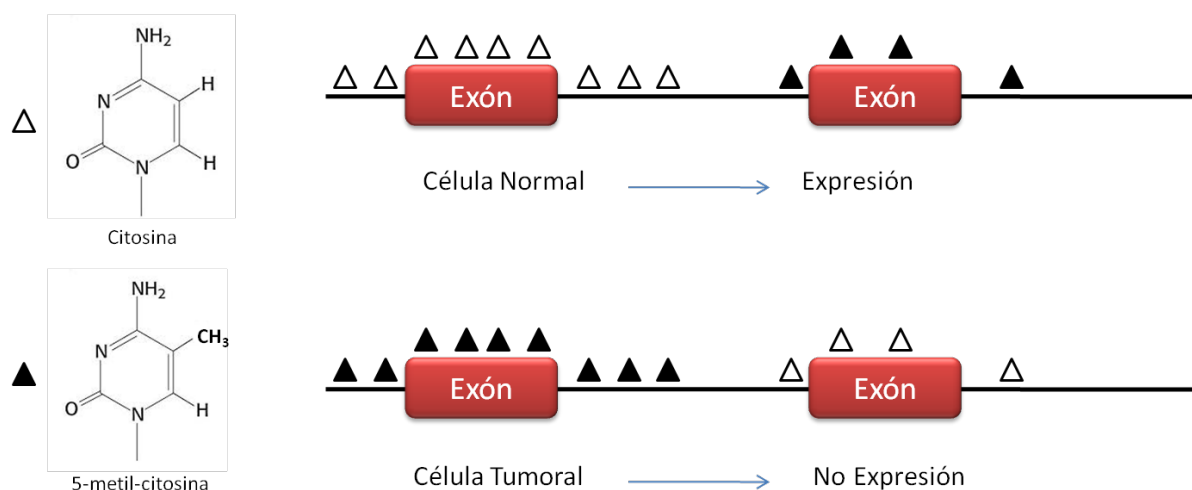


Figura 1.14. Representación esquemática de la distribución de la metilación en células normales y tumorales

4.1.1. Hipometilación global del genoma.

Esta hipometilación se relaciona con la inestabilidad cromosómica (Bestor y cols., 1996) induciendo la expresión de secuencias trasposónicas como las LINES (Long Interspersed Nuclear Elements) (Carnell y cols., 2003). Además, provoca una activación de oncogenes, factores de crecimiento y genes involucrados en los procesos de proliferación celular, invasión y metástasis (Szyf y cols., 2004).

4.1.2. Hipermetilación de las islas CpG de la región promotora.

La hipermetilación se encuentra asociada al silenciamiento génico de genes constitutivos y genes supresores de tumores. Dentro de los genes constitutivos silenciados se pueden encontrar genes reparadores del DNA, reguladores del ciclo celular, angiogénesis e implicados en la transducción de señales entre otros (Das y cols., 2004).

Esta hipermetilación puede producirse mediante dos mecanismos:

a) La metilación del DNA directamente inhibe la unión de los factores de transcripción como AP-2, c-Myc/Myn, E2F y NFkB a sus sitios de unión en la secuencia del promotor.

b) Unión de proteínas específicas de m5CpG dinucleótidos al DNA metilado. Este DNA metilado recluta m5CpG-binding (MeCP) y m5CpG-binding domain (MBD) proteins. MeCP1 y MeCP2 se unen específicamente al DNA metilado en todo el genoma y forma un obstáculo espacial que no permite la unión de los factores de transcripción a la secuencia del promotor.

5. Mecanismos de resistencia

Los sistemas de reparación del DNA son los encargados de mantener la integridad del genoma neutralizando múltiples y profundos daños en el DNA producidos por agentes físicos y químicos. Los sistemas de reparación más importantes implicados en el mecanismo de acción de los triazenos son O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferasa (MGMT), la reparación de errores del DNA (MMR) y la reparación de las pérdidas de bases.

Estos mismos sistemas son los que provocan una resistencia al tratamiento ya que reparan el DNA dañado por el agente alquilante utilizado para tratar estos tumores.

5.1. MGMT

La O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferasa (MGMT) es una proteína reparadora del DNA que protege al genoma de la célula de los efectos mutagénicos de los agentes alquilantes como la temozolamida. La alquilación del DNA en la posición O⁶ de la guanina es uno de los eventos más críticos que permiten la inducción de mutaciones de transición y cáncer (Marchesi y cols., 2007). Debido a esto se ha propuesto MGMT como un factor pronóstico en el cual los pacientes que no expresan dicha proteína, es decir, que la tienen silenciada responden mejor al tratamiento con temozolamida. La expresión de MGMT se considera por lo tanto un factor de resistencia frente al tratamiento.

5.1.1. Mecanismo de acción

En las células humanas, MGMT tiene una expresión constitutiva aunque variable en algunos tejidos. El gen se localiza en el cromosoma 10q26 y contiene 5 exones y 4 intrones. La región del promotor es rica en CpG, carece de caja TATA y CAAT y tiene diez sitios Sp1 de unión

a factores de transcripción y dos elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs). Dicho promotor tiene una secuencia de 1.2kb que incluye el primer exón y parte del primer intrón (Marchesi y cols., 2007; Pegg y cols., 2007) (Figura 1.15)

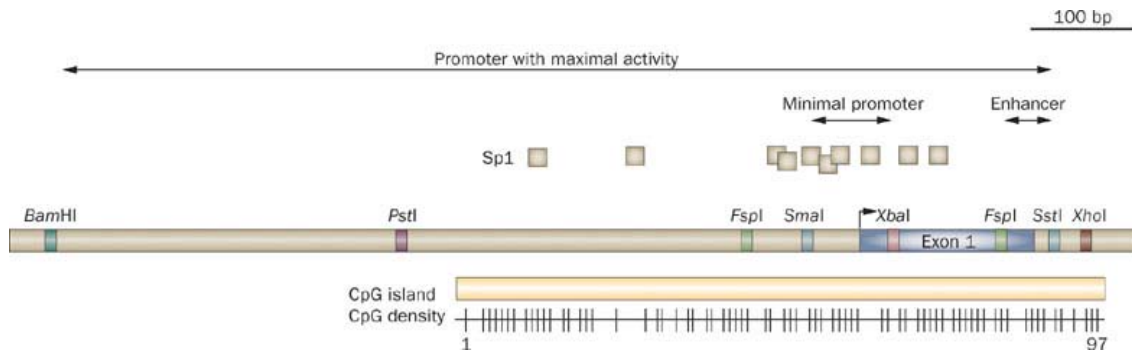


Figura 1.15. Esquema representativo de la estructura del promotor del gen de MGMT (Weller y cols., 2010)

Esta proteína tiene como función la reparación del DNA eliminando residuos alquilantes del átomo O6 de la guanina en el DNA provocados por la acción de agentes alquilantes como la temozolamida.

El mecanismo de reparación mediado por MGMT consiste en una transferencia de estos grupos alquilantes a un sitio activo interno representado por un residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos de la proteína. El residuo de cisteína en las células humanas se localiza en la posición 145 dentro de una secuencia muy bien conservada. Esta transferencia inactiva de forma irreversible la molécula de MGMT por lo que a esta proteína también se la denomina enzima suicida. El MGMT alquilado es ubiquitinizado y después degradado mediante el sistema de ubiquitin/proteasoma. Por lo tanto MGMT no se puede reutilizar después del proceso de reparación, debe ser resintetizado de novo por las células (Estellery cols., 1999; Blough y cols., 2007) (Figura 1.16).

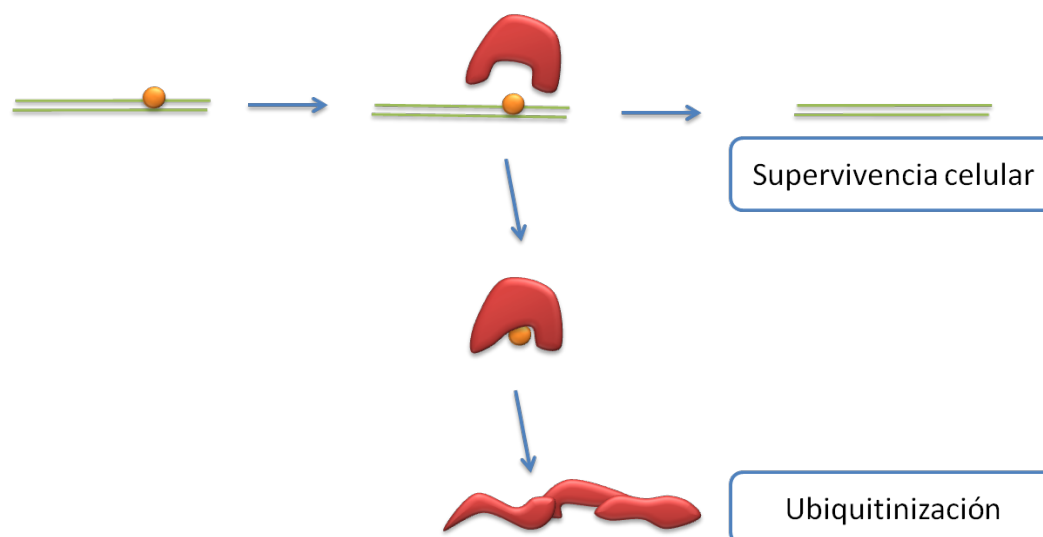


Figura 1.16. Mecanismo de reparación del ADN por el enzima MGMT (Modificado de Liu y cols., 2006.)

La transcripción del gen MGMT está sujeta a varios mecanismos de regulación. En particular, la metilación del promotor parece ser la más importante ya que regula el silenciamiento del gen, observándose hipermetilación de las islas CpG del promotor.

5.1.2. Respuesta de MGMT a los agentes alquilantes

Los agentes alquilantes son moléculas muy reactivas que causan la muerte celular cuando se unen al DNA. El sitio más frecuente de alquilación es la posición O⁶ de la guanina. La alquilación forma un entrecruzamiento entre hebras de DNA adyacentes. Ese entrecruzamiento es inhibido por MGMT que rápidamente revierte la alquilación O⁶ de la guanina. A través de este mecanismo, MGMT, causa la resistencia a drogas alquilantes.

Los niveles de MGMT varían respecto al tipo de tumor e incluso dentro del mismo tipo de tumor. Por ejemplo, un 30% de los gliomas carecen de MGMT. Esta deficiencia puede incrementar la sensibilidad de los tumores cerebrales a agentes alquilantes. Como MGMT normalmente no está mutado ni delecionado, su deficiencia se debe a cambios que no alteren

la información genética de la célula, como puede ser la metilación. Una metilación de sitios normalmente no metilados, como son las islas CpG, en regiones del promotor se correlaciona con pérdida de expresión genética en líneas celulares de cáncer y en tumores primarios. Una metilación de las islas CpG en el promotor de MGMT impide la transcripción del gen y por lo tanto impide que se reparen las alquilaciones O^6 de la guanina (Esteller y cols., 2000) (figura 1.17).

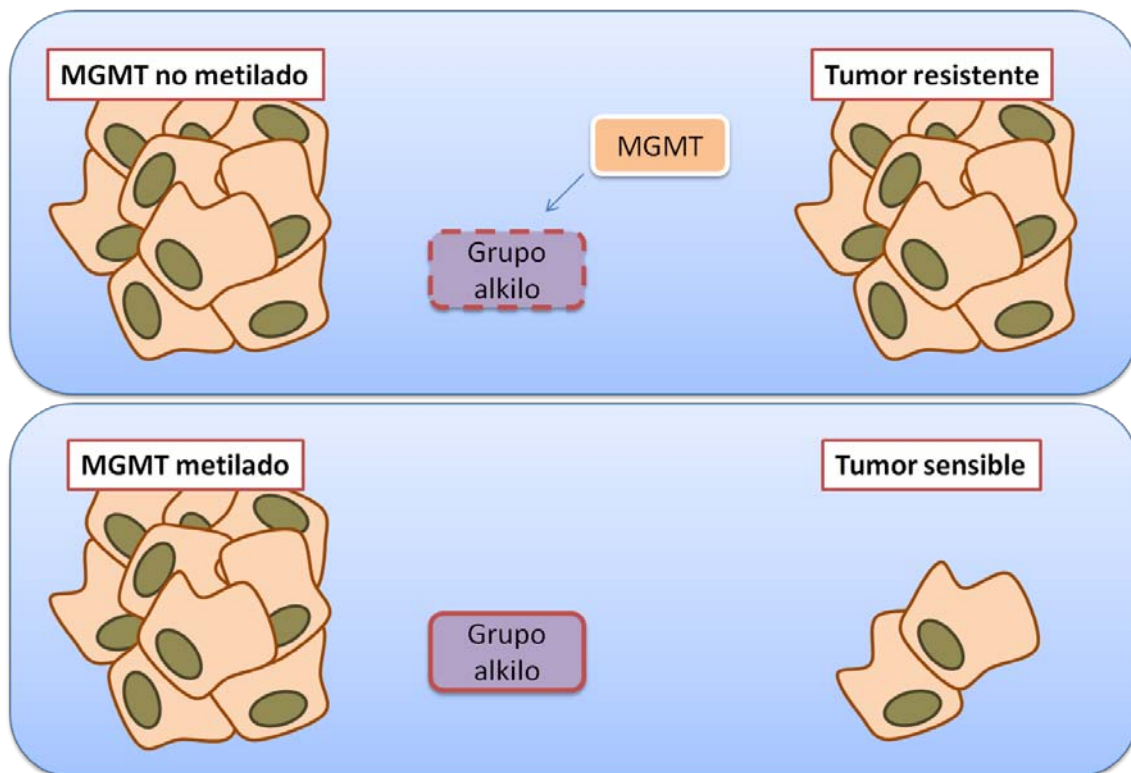


Figura 1.17. Representación del mecanismo de inactivación de MGMT mediante la metilación de las islas CpG de su promotor (Modificada de Esteller y cols., 2000)

El silenciamiento epigenético de MGMT mediante la metilación de su promotor está asociado a una mayor supervivencia en pacientes con glioblastoma, que además de la radioterapia, reciben quimioterapia alquilante con carmustina o temozolamida.

Múltiples estudios han observado una correlación entre los niveles de MGMT y el nivel de respuesta a quimioterapia. Esto sugiere que los niveles de MGMT se podrían usar como factor predictivo de respuesta a la quimioterapia.

En varios estudios se ha observado que aproximadamente del 35% al 60% de los pacientes con glioblastoma tenían el promotor de MGMT hipermetilado teniendo estos una mayor tasa de supervivencia (figura 1.18). Se compararon con pacientes con el promotor no metilado que recibieron radioterapia y temozolamida obteniéndose resultados discretamente superiores a los que recibieron únicamente radioterapia, aunque ambos subgrupos tuvieron peor respuesta que los pacientes con MGMT metilados (Hegi y cols., 2005).

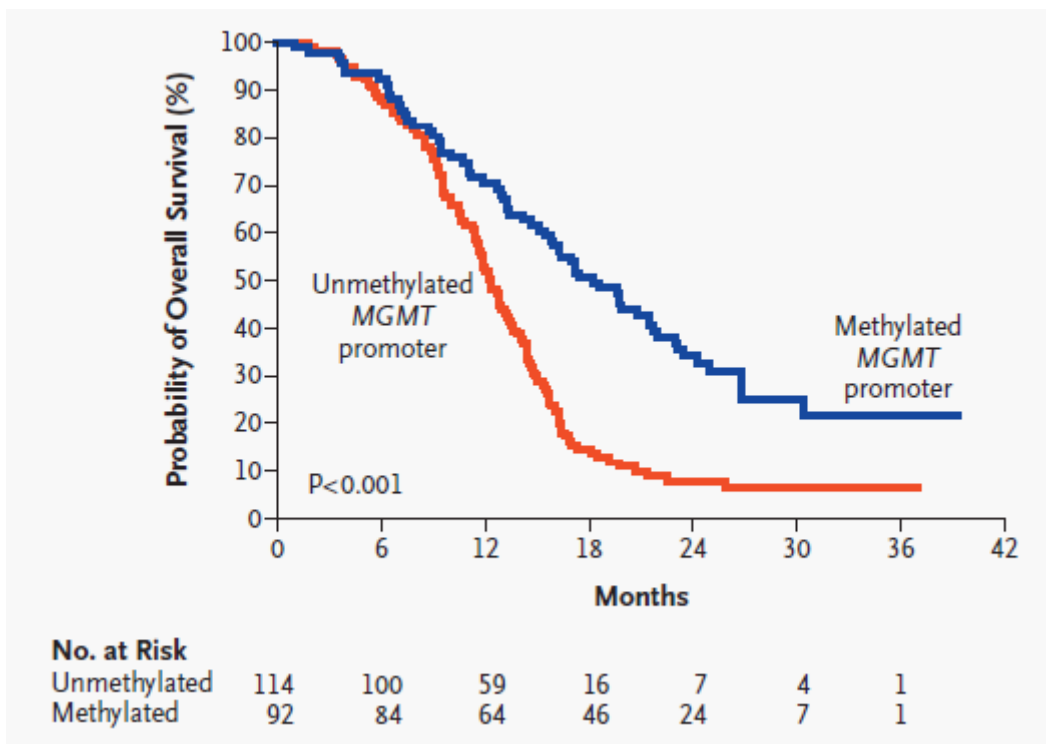


Figura 1.18. Supervivencia de los pacientes con glioblastoma atendiendo al estado de metilación de MGMT (Hegi y cols., 2005).

5.1.3. Regulación clínica de MGMT

El descubrimiento de que altos niveles de MGMT son responsables, al menos en parte, de la resistencia de las células tumorales a los triazenos, estimuló la búsqueda de programas para sintetizar compuestos que regularan la actividad de MGMT. Actualmente, el O⁶-benzylguanine (O⁶-BG), y el O⁶-(4-bromoteny)l guanine (Lomeguatrib/PaTrin-2), son los más utilizados en clínica.

El inhibidor O⁶-BG, un compuesto no tóxico, se une al sitio activo del MGMT que se comporta como un aceptor del grupo benzyl, permitiendo la formación de S-Benzylcysteine acompañado de una liberación estequiométrica de guanina.

In vitro e in vivo, pre-tratamientos con O⁶-BG en tumores con alta expresión de MGMT incrementan la sensibilidad a la temozolamida. Sin embargo, el mayor problema de la utilización clínica de inhibidores de MGMT en combinación con triazenos u otros O⁶-G agentes alquilantes en tumores sólidos, es la toxicidad en la médula ósea. De hecho, el inhibidor regula la expresión de MGMT en el tumor y en las células de la médula ósea, donde ejerce un mayor efecto citotóxico.

El inhibidor más reciente de MGMT (Lomeguatrib/PaTrin-2) parece ser menos tóxico que el O⁶-BG. Su mecanismo de acción es también muy similar. Se ha demostrado que reduce los niveles de MGMT en líneas celulares de carcinoma de ovario y sensibiliza sustancialmente estas células frente a la TMZ. Estudios in vitro han demostrado también que incrementa los efectos citotóxicos de la temozolamida en células de leucemia humanas (Marchesi y cols., 2007)

5.2. MMR

La función principal del MMR (Mismatch repair system) es reconocer y reparar aquellos errores producidos durante la replicación del DNA que no hayan sido reparados por las polimerasas. Este mecanismo también promueve la estabilidad genética ya que está implicado en la reparación de las roturas de la doble hebra y en la recombinación. Además, algunos componentes del MMR están implicados en la regulación del ciclo celular y la apoptosis dependiente de p53 (Jacob y cols., 2002).

5.2.1. Mecanismo de acción

El MMR es otro de los sistemas de reparación del DNA. Se identificó originariamente en bacterias aunque no fue hasta 1990 cuando se demostró que una inactivación de este mecanismo correspondía con la causa principal de desarrollo de cáncer de colon hereditario no poliposico (HNPCC) (Bronner y cols., 1994).

Este sistema se encuentra altamente conservado en humanos (Ioana y cols., 2010), donde existen varios homólogos a las proteínas bacterianas. La proteína mutS tiene como homóloga a MSH2, que repara errores simples y deleciones de hasta 4 nucleótidos. Esta proteína puede formar heterodímeros con otros homólogos como hMSH3 y hMSH6. La proteína bacteriana MutL tiene como homólogo al heterodímero MLH1-PMS2 junto a PMS1 (Happold y cols., 2012; Jeppesen y cols., 2011).

El mecanismo de reparación MMR consta de las siguientes etapas consecutivas (Jeppesen y cols., 2011) (figura 1.19):

1- Reconocimiento y unión del error. Esto es llevado a cabo por un complejo heterodimérico con función ATPasa, compuesto por MSH2-MSH6 o MSH2-MSH3. En el caso de reconocer desajustes en el apareamiento de bases o bucles de inserción-delección de uno o dos nucleótidos el heterodímero se formará con MSH2-MSH6 preferentemente. Si los bucles de

inserción tienen más de una o dos pares de bases, entonces se formará con MSH2-MSH3. Este heterodímero, ya sea MSH2-MSH6 o MSH2-MSH3, recluta al complejo MLH1-PMS2 con quien forma un complejo terciario. La pinza (proliferating cell nuclear antigen (PCNA)) recluta proteínas del MMR hacia la horquilla de replicación mientras que RFC carga PCNA. Un gap específico de la hebra, que puede estar en 5' o 3' del error, es suficiente para la reparación directa dirigida por el MMR. PCNA parece esencial para la 3' pero no para la 5'.

2- Escisión. La escisión parece que es llevada a cabo por la exonucleasa EXO1 en ambos casos ya sea dirección 3' o 5'. En dirección 5' la escisión es directa por la actividad 5'-3' de la exonucleasa. En el caso de ser en dirección 3', se activa la función endonucleasa de PMS2 estimulando a RFC, PCNA y ATP para introducir un segundo gap necesario en 5', para que así pueda actuar la EXO1.

3- Reparación y ligación. La reparación se lleva a cabo con precisión por la polimerasa (Delta), mientras que la ligación de los gaps que quedan después de la síntesis es llevada a cabo por la ligasa LIG1.

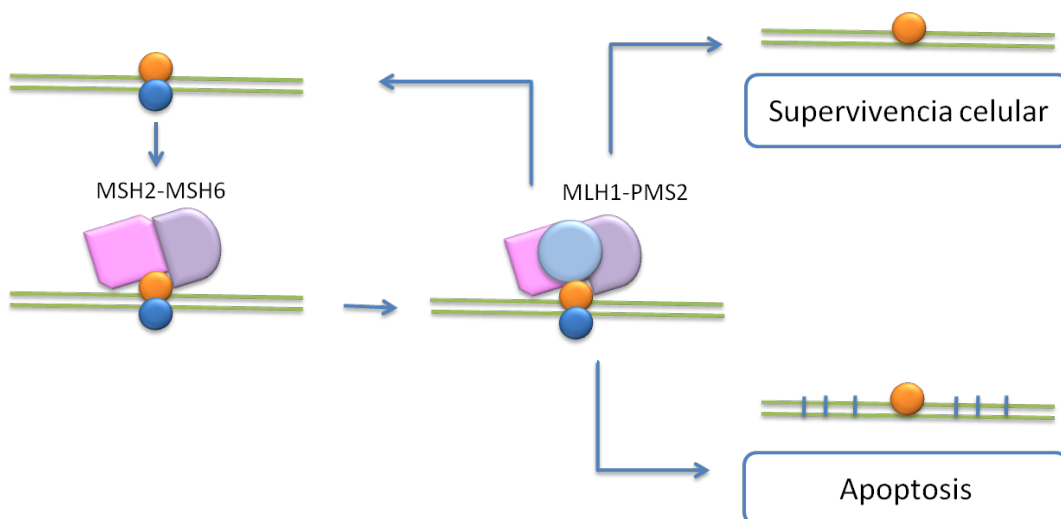


Figura 1.19. Reparación de apareamientos erróneos humanos. (Modificado de Liu y cols., 2006)

Cuando el daño no puede ser reparado el sistema MMR conduce a la célula hacia un punto de control y posteriormente al daño celular. Aunque todavía no está claro, existen varios mecanismos que pretenden explicar este sistema. Uno de estos mecanismos es por acción indirecta del sistema MMR. Esta acción consistiría en general ciclos de reparación del DNA repetitivos tras los cuales la hebra acabaría dañada generando una rotura en la doble hélice, ejerciendo un efecto citotóxico sobre la célula. Otro modelo sugiere un papel directo del MMR que consiste en un reconocimiento directo del daño en el DNA y tras esto, el reclutamiento de proteínas asociadas al MMR que transmiten una señal que permite la activación de uno o más puntos de control del ciclo celular (O'Brien y cols., 2006). La inactivación del sistema MMR favorece la acumulación de mutaciones, particularmente en secuencias altamente repetidas como los microsatélites, distribuidas a través del genoma, lo que da lugar a una inestabilidad de los microsatélites. Esto está muy relacionado con la susceptibilidad de padecer HNPCC hereditario aunque también se ha detectado en esporádico (Ioana y cols., 2010)

5.2.2. Respuesta de MGMT a los agentes alquilantes

Células de carcinoma de colon son hasta 60% más resistentes a la quimioterapia con fármacos alquilantes cuando se mutan los genes MMR.

En el caso de los glioblastomas, en pacientes con el promotor de MGMT metilado, es decir, sin expresión de MGMT, se ha relacionado el tratamiento con TMZ con una deficiencia en el sistema MMR (Nature 2008). Existen estudios como el de Yip 2009 y Maxwell 2008 en que relacionan la resistencia al fármaco y una recaída del tumor a las mutaciones/alteraciones de MSH6 y otros como el de Cahill, 2007 que lo asocian a deleciones de MSH6. En otros estudios como el de Felsberg 2011, determinan una disminución de la expresión de MMR en glioblastomas recurrentes.

5.3. P- Glicoproteína

P-glicoproteína es una proteína transportadora dependiente de ATP que se encuentra en la membrana plasmática. La estructura de dicha proteína recuerda a la estructura de la superfamilia de trasportadores tipo ABC. Está formada por 1.280 aminoácidos con dos dominios de unión a ATP ubicados en la parte citoplasmática, un sitio de glucosilación y varios sitios de fosforilación (Casale y cols., 2004) (figura 1.20). Estos dominios determinan la especificidad de sustrato, ya que son la vía por la que éste atraviesa la membrana requiriendo un cambio conformacional de la proteína dependiente de energía (Lin y cols., 2003).

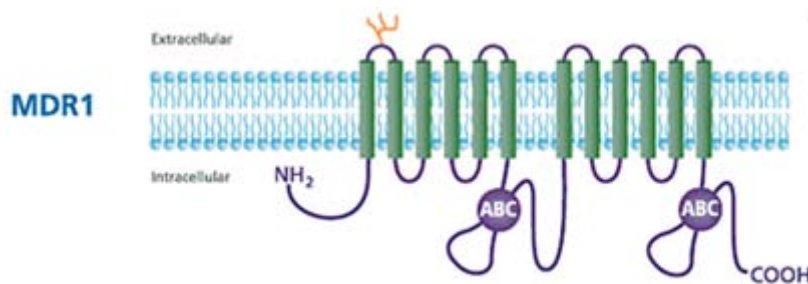


Figura 1.20. Estructura de los transportadores MDR1

En humanos, esta familia está compuesta por dos genes, MDR1 y MDR3 cuya función está asociada al transporte de fármacos a través de la membrana (Lin y cols., 2003). P-Glycoproteína se encuentra expresada en diferentes tejidos como la superficie canalicular de los hepatocitos en el hígado, las células epiteliales del intestino o de la placenta y la superficie luminal de la barrera hematoencefálica (BBB) (Wessler y cols., 2013). Esto sugiere que la función que desempeña sea la de proteger al organismo de los xenobióticos tóxicos excretando dichos compuestos a la orina, al lumen intestinal o evitando una acumulación de

los mismos en el cerebro. Debido a esto se da el llamado fenómeno de resistencia a multidrogas (MDR) que provoca una resistencia al fármaco en casos tumorales.

La BBB está formada por células endoteliales de los capilares cerebrales, que se caracterizan por uniones estrechas altamente desarrolladas entre las células adyacentes y una escasez de fenestra y vesículas pinocíticas. Debido a estas características anatómicas, la BBB trabaja como una pared estática entre el parénquima cerebral y la circulación sanguínea. Por lo tanto, la ruta trans celular es la mayor vía de intercambio de componentes entre los dos compartimentos. Además, las evidencias acumuladas sugieren el papel de múltiples transportadores de eflujo localizados en la cara luminal o abluminal de la membrana de las células endoteliales de los capilares del cerebro en la extrusión activa de sus sustratos desde el SNC, dando así otra función de barrera a la BBB. (Sun et al., 2003; Kusuhara and Sugiyama, 2005; Urquhart and Kim, 2009).

5.3.1. Mecanismo de acción

Se han propuesto varios modelos para describir el mecanismo de transporte del fármaco. Hay hipótesis que sugieren que las regiones de la proteína forman un poro tras el cual los fármacos son transportados desde el citosol al medio extracelular (Ford y cols., 1990). Otras hipótesis apuntan a una expulsión directa la unión de un sustrato y la molécula de ATP se producen simultáneamente. Después de la unión de cada uno, la hidrólisis de ATP se desplaza el sustrato en una posición para ser excretada de la célula. La liberación del fosfato se produce al mismo tiempo que la excreción de sustrato. ADP se libera, y una nueva molécula de ATP se une al sitio de unión a ATP secundaria. La hidrólisis y liberación de ADP y una molécula de fosfato restablece la proteína.

6. Células madre tumorales

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.

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.

6.1.1. Identificación de las CSC

En el pasado las CSC de GBM se caracterizaban en base a criterios funcionales. Últimamente se ha demostrado que las CSC tienen una proteína de superficie que puede ser detectada con un anticuerpo, el CD133 (prominina 1) que 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., (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. Aislado células CD133 positivas e implántandolas en cerebros de ratones inmuno deprimidos se observaba la obtención de gliomas, en cambio no sucedía esto si las células eran CD 133 negativas.

Sin embargo la no sólo las células CD133 positivas son capaces de reproducir el tumor en ratones inmunodeficientes Beier y cols., (2007) han descrito como GBM que no contienen células tumorales CD133 positivas se han identificado CSC CD133 negativas que se asemejan en términos de diferenciación y tumorigenicidad a las positivas.

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).

6.1.2. Efecto de la radioterapia sobre las CSC

Existen estudios como el de Bao y cols., (2006) en los que se determina el efecto de la radiación sobre líneas celulares de gliomas y muestras quirúrgicas de pacientes. Los resultados obtenidos indicaban que la fracción de células CD133 positivas se incrementaba tras el tratamiento con radioterapia, esto era debido a que la reparación del daño en el DNA inducido por la radiación era más eficaz en las células CD133 positivas. Estudios como los de Ropolo y cols., en 2009 en líneas celulares de glioblastoma concuerdan con los resultados del estudio

anterior obteniendo que en las células CD133 positivas existe una activación basal mayor de las proteínas de control del ciclo celular que podrían contribuir a su radio resistencia.

Objetivos

II. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este estudio son:

- 1.- Determinar el estado de metilación del promotor del gen *MGMT* en pacientes con glioblastoma multiforme y su utilidad como factor pronóstico de respuesta al tratamiento con temozolamida.
- 2.- Determinar *in vitro*, en cultivos de células tumorales de sistema nervioso, el estado de metilación del promotor de *MGMT* y la expresión de esta enzima, tras el tratamiento con la dosis inhibitoria 50 (IC_{50}) de temozolamida estableciendo su implicación en la resistencia a este fármaco.
3. Determinar *in vitro* el nivel de expresión del completo MMR de reparación del ADN en cultivos de células tumorales de sistema nervioso y analizar su modulación e implicación en la resistencia tras el tratamiento con la dosis inhibitoria 50 (IC_{50}) de temozolamida.
4. Determinar *in vitro* el nivel de expresión de la proteína de resistencia a multidroga P-glicoproteína, y analizar su modulación e implicación en la resistencia de las líneas celulares tumorales tras el tratamiento con la dosis inhibitoria 50 (IC_{50}) de temozolamida.
- 5.- Determinar *in vitro* el nivel de expresión del marcador de células madre tumorales CD133 y su posible implicación en la resistencia a la temozolamida.

Material y Métodos

III. MATERIAL Y MÉTODOS

ESTUDIOS EN PACIENTES

1. Población de estudio

Se estudiaron de forma retrospectiva 53 pacientes diagnosticados de glioblastoma multiforme, 43 de ellos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y 12 pacientes del Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz. Los 43 pacientes del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, han sido utilizados en un estudio previo, que forma parte de la Tesis Doctoral de Dña. Beatriz González Astorga, realizado sobre 78 pacientes (43 del Hospital Virgen de las Nieves de Granada y 35 del Hospital de Sassari, Italia), y publicado en J. Trans. Med. (Melguizo y cols., 2012) Todos los pacientes habían sido sometidos de forma prospectiva a tratamiento quimio-radioterápico con temozolamida y de los que se disponía de 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.

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.

Las muestras fueron procesadas para determinar el estado de metilación del promotor del gen de la enzima de MGMT mediante MSP.

3. Determinación del estado de metilación de MGMT

3.1 Desparafinación de las muestras

La extracción de DNA desde muestras incluidas en parafina requiere de diferentes pasos hasta obtener el DNA deseado. 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.

En primer lugar la muestra procesada se incubó con Xileno durante 45 minutos a 37°C, posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos para eliminar el Xileno sobrante. En los casos en los que se observaron coágulos de parafina, se eliminó el Xileno de la muestra con concentraciones descendentes de etanol y se realizó una segunda incubación con Xileno. El pellet obtenido tras eliminar de nuevo el xileno, se re suspendió en 1ml de etanol 100%, y se incubó durante 1 minuto centrifugando a continuación a máxima velocidad. Las muestras se incubaron con concentraciones descendentes de etanol, primero 90% y después 70% para la eliminación del Xileno de la muestra. Finalmente, se incubó con 200 µl de Tween 20 al 0,5% en un termociclador durante 10 minutos a 90°C y 1 minuto a 65°C, centrifugando 5 minutos a máxima velocidad para eliminar el tween 20.

3.2 Digestión del tejido desparafinado

Para la digestión del tejido desparafinado se resuspendieron las muestra en 180 µl de buffer ATL y se añadió 20 µl de proteinasa K. Esta mezcla se dejó incubar durante 45 minutos a 56°C y a 28 °C de 5 a 10 minutos para obtener el máximo rendimiento de la enzima.

3.3 Eliminación de las interacciones ADN-paraformaldehido

La formación de interacciones ADN-paraformaldehido es propia de muestras incluidas en parafina. Para su eliminación se incubó la muestra durante 55 minutos a 90 °C y después a 28°C entre 10 y 5 minutos, procediendo rápidamente a realizar la extracción de DNA para evitarla fragmentación del DNA.

3.4 Extracción de ADN del tejido desparafinado

Una vez revertidas las interacciones DNA-paraformaldehido se procedió a la extracción de ADN del tejido mediante un protocolo de columnas. Para ello se añadieron 200 µl de un buffer de lisis (buffer AL) y seguidamente 200 µl de etanol 100%. Se vorteo bien para disolver el precipitado blanco. Una vez obtenido el lisado celular, se depositó en una columna Qiamp Minielute y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm para retener el ADN y eliminar el buffer de lisis y el etanol. Una vez retenido el ácido nucleico en la columna se lavó mediante la adición de 500 µl de buffer de lavado (buffer AW1) dejándolo actuar 5 minutos en la columna y centrifugándolo después 1 minuto a 8000 rpm. Se eliminó el eluido y se repite el proceso con un segundo buffer de lavado (buffer AW2).

Una vez lavado el ADN retenido en la columna se procedió a realizar una centrifugación de la columna a máxima velocidad para eliminar los restos de etanol y secar completamente la membrana. Finalmente la muestra fue eluida mediante la adición de 30 µl

de agua libre de RNAsas dejando incubar 5 minutos antes de centrifugar. El ADN obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

4. Modificación del DNA mediante Bisulfito Sódico

Una vez que se obtuvo el DNA de las muestras se procedió a realizar la conversión de 2 µg de este DNA con Bisulfito de Sodio. El bisulfito sódico actúa sobre el DNA transformando las citosinas no metiladas en uracilos y conservando intactas las citosinas metiladas, tal y como muestra la siguiente tabla (tabla x). Por lo tanto, el tratamiento de bisulfito permite diferenciar entre las secuencias de ADN metiladas y las no metiladas.

	Secuencia original	Secuencia post-bisulfito
DNA Metilado	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N
DNA No Metilado	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N

4.1 Pretratamiento del DNA con bisulfito sódico

Las muestras se prepararon según las indicaciones del fabricante (EpiTect bisulfite), añadiendo al DNA de partida 85 µl de mix de bisulfito y 35 µl de protector del DNA en ese orden hasta un volumen total de 200 µl.

La conversión del Bisulfito se realiza mediante una PCR cuyos ciclos se detallan en la siguiente tabla.

Paso	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	25 min	60°C
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	85 min	60°C
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	175 min	20°C
Mantenimiento	Infinito	20°C

4.2 Lavado del DNA

Una vez realizada la conversión se procedió a una limpieza del producto del bisulfito mediante un protocolo de columnas (kit). En primer lugar, se añadieron 310 μ l de Buffer BL para cada muestra del producto del bisulfito, y 250 μ l de etanol 100 %, mezclando con vortex durante 15 segundos. La mezcla obtenida se depositó en las columnas spin Epiect centrifugando a continuación dichas columnas a máxima velocidad (14 000 rpm). Tras eliminar el filtrado se procedió a lavar la columna con 500 μ l del buffer de lavado BW. Una vez centrifugado se incubó la columna con 500 μ l del buffer BD, buffer de desulfonación, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Trascorrido ese tiempo se centrifugó para eliminar todos los posibles restos de este buffer y se lavó la columna dos veces con el buffer BW. Tras una centrifugación sin nada se incubó la columna a 56°C durante 5 minutos para que se evapore cualquier resto de etanol que pueda quedar en la columna. Tras dejar atemperar la muestra se procede a la elución del producto con 25 μ l de agua libre de RNasas. El eluido es almacenado a -20°C hasta su uso.

5. PCR específica de metilación del promotor del gen MGMT (MSP)

Una vez obtenido el DNA modificado mediante bisulfito sódico se realizó una PCR específica de metilación (MSP) para determinar si el promotor del gen MGMT estaba metilado o no metilado. Para ello se realizan dos PCRs, una con cada pareja de primers, utilizando la RED Taq Genomic DNA Polymerase (Sigma - Aldrich, Sant Louise, USA).

Primer		Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
Metilado	Fw	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC	81
	Rv	GCACTCTCCGAAAACGAAACG	
No metilado	Fw	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT	93
	Rv	AACTCCACACTCTCCAAAAACAAAACA	

Mezcla de Reacción

Componente	Concentración
DNTP's	200µM
Primers	0,1 µM
Buffer 10X	1X
Muestra	10ng
Taq	0,05 unidades/µl
Volumen final	25ul

Condiciones de Reacción

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos, min; segundos, seg)	Nº de ciclos
94	7 min	1
94	30 seg	30
58	30 seg	
72	30 seg	
72	10 min	1
4	Infinito	

El resultado obtenido en esta PCR se cargó en un gel de agarosa al 3% con Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich) y se visualizó en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories, S.A.)

ESTUDIOS A NIVEL CELULAR

1. Cultivos celulares

1.1 Líneas celulares

Las líneas objeto de estudio y sobre las que se desarrollaron los diferentes ensayos, son la líneas celulares; SK-N-SH de neuroblastoma, obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection); SF268 de glioblastoma, obtenida del Banco de Células del Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada; A172 y LN229, líneas de glioblastoma cedidas por la Dra. María Berdasco del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge.

1.2 Cultivo de líneas celulares

Todas las líneas celulares se mantuvieron en cultivo en frascos estériles tipo Falcons (de 25 ó 75 cm², Sarstedt), en estufa (Steri-Cult CO₂ Incubator, Thermo Electrón Corporation, USA) a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. La manipulación de los cultivos se realizó, bajo condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar (Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments, Italy)

Las líneas celulares utilizadas en este estudio (SF268, SK-N-SH, A172 y LN229) fueron cultivadas en el medio Dubelcco's Eagle modificado (DMEM) (Gibco, USA) suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (FBS) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) y penicilina/estreptomina (Biochrom KG) al 5%.

1.3 Descongelación de las líneas celulares

La descongelación de los criotubos, con los cultivos celulares, se realizó, bajo condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar. Para ello, se limpió este el criotubo con

alcohol al 70% y se abrió en condiciones de esterilidad, resuspendiendo las células en medio de cultivo estéril a 37 °C. Tras centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm se resuspendió el pellet y se lavó con PBS para eliminar los restos de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Tras una segunda centrifugación de 5 minutos a 1500 rpm se resuspendió el botón celular en medio de cultivo completo para sembrarlo en frascos estériles tipo Falcon de 25 cm².

1.4 Mantenimiento de las líneas celulares

Los diferentes cultivos se mantienen en Falcons de 25 o 75 cm² según la técnica para las que se vayan a utilizar las células. El medio de cultivo (DMEM, 10% FBS, 5% antibiótico) se cambió bajo condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar, siendo reemplazado cada 48 h o cuando se produce el viraje del rojo fenol, indicativo del agotamiento del medio.

Cuando los cultivos celulares alcanzaban una confluencia del 80-90%, eran resembrados en nuevos Falcons de 25 o 75 cm², para ello, se desecha el medio de cultivo y las células son lavadas con PBS (Tampón salino de fosfato, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), con un volumen de 0,2 ml/cm². A continuación, se añade 0,1 ml/cm² de PBS-EDTA previamente atemperado a 37 °C (0,04% EDTA en PBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y se incuba durante 2-3 minutos a 37 °C en estufa de CO₂. Una vez que las células se han despegado, en la cabina de flujo laminar se añade 1ml/cm² de PBS para recoger las células despegadas que se centrifugan durante 5 minutos a 1500 rpm resuspendiendo el botón celular obtenido en 1 ml de DMEM completo.

La densidad celular será determinada con una cámara de conteo o cámara de Neubauer (Zuzi Corp., France) lo que nos permitirá sembrar la cantidad de células deseada en función del ensayo a realizar.

1.5 Congelación de las líneas celulares

Los cultivos celulares para su almacenamiento, se congelan en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para ello, se utiliza medio de congelación constituido por suero bovino fetal inactivado en calor húmedo a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, y DMSO al 10%. Las células se despegan de los frascos de cultivo mediante PBS-EDTA (ver apartado “Mantenimiento de las líneas celulares”). El botón celular se resuspende a razón de $0,5 \times 10^6$ células por ml de medio de congelación y se introduce inmediatamente en criotubos (Nunc, USA) llevándose a cabo una congelación progresiva que garantiza una mayor viabilidad de los cultivos celulares, hasta llegar a almacenarse en contenedores de nitrógeno líquido.

2. Tratamiento de las líneas celulares

Las líneas celulares de estudio se sometieron a diferentes tratamientos con Temozolamida, (TMZ), O(6)-benzilguanina (O6BG) y 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza) (Sigma-Aldrich) y cloruro de cadmio (Sigma-Aldrich) detallados en la tabla. Para cada línea de estudio se obtuvo la dosis inhibitoria 50 (IC_{50}) con la Temozolamida mediante ensayos de proliferación celular. Así mismo se realizaron pre-tratamientos con O(6)-benzilguanina en aquellas líneas con expresión de MGMT para obtener un silenciamiento del mismo y un pre-tratamientos con 5-aza-2'-deoxicitidina en aquellas líneas sin expresión de MGMT para lograr dicha expresión.

Línea celular	Tratamiento	Dosis	Pretratamiento	Cambio de medio	Re-administración del fármaco	Duración
A172/LN229/ SF229/SK-N-SH	TMZ	1-400 μ M	No	Cada 3 días	Si, cada cambio de medio	6 días
A172/LN229/ SF229/SK-N-SH	TMZ	IC50	No	No	No	3 días
A172/LN229	5AZA	10 μ M	3 días	Cada 3 días	Si, cada cambio de medio	6 días
SF229/SK-N-SH	5AZA	5 μ M	2 horas	Cada 3 días	Si, cada cambio de medio	6 días
SF229/SK-N-SH	O6BG	30 μ M	2 horas	Cada 3 días	Si, cada cambio de medio	6 días
A172/LN229	CICd2	2 μ M/ 12,5 μ M	9 horas y 3 días	No	No	9 horas y 3 días
A172/LN229/ SF229/SK-N-SH	Verapamilo	14,25 μ M	24 horas	Cada 3 días	Si, cada cambio de medio	6 días

3. Ensayo de proliferación celular

Para determinar la CI_{50} para TMZ, se sembraron 3×10^3 células/pocillo en placas de 24 pocillos (Iwaki Microplate, Japan). Tras 24 horas de cultivo, tiempo suficiente para que las células se adhieran a la superficie del frasco de cultivo, se realiza la adición de TMZ en concentraciones crecientes desde 1 – 700 μ M. Los cultivos se mantienen expuestos a la temozolamida durante 6 días, siendo reemplazado el medio y la TMZ cada 3 días. Se utilizaron como control para cada experimento cultivos paralelos de células sin adición de drogas, y un control de DMSO, medio en el que se resuspende el fármaco.

El método empleado para el análisis de la proliferación celular es el método de tinción con Sulforrodamina-B (SRB) siguiendo el protocolo propuesto por Papazisis y cols., (1997). Tras eliminar el medio de cultivo de los pocillos de las placas, en condiciones de no esterilidad, se añade 300 μ l de ácido tricloroacético (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) frío al 10% y se deja incubando durante 20 minutos a 4 °C, lavándose a continuación 3 veces con agua

bidestilada y dejando secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se añade 300 μ l de SRB al 0,4% en ácido acético (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) al 1% y se deja incubar en agitación 20 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de SRB, se lavan las placas 3 veces con ácido acético al 1% dejándose secar 24 horas a temperatura ambiente. El colorante fijado sobre las células es solubilizado utilizando 300 μ l de una solución 10mM Tris-base pH 10.5 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en agitación. Alícuotas de 100 μ l se transfieren a placas de 96 pocillos (Iwaki Microplate, Japan) y se leen en un colorímetro (Multiskan Ex Thermo Electron Corporation, Usa) a una longitud de onda de 492nm.

Los valores de densidades ópticas se obtuvieron usando un programa informático "Ascent Software for Multiskan" para Windows v.2,6 (Thermo Labsystems, USA). Posteriormente se lleva a cabo un análisis de supervivencia mediante gráficas que relacionan la concentración del fármaco (eje X), con el valor de densidad óptica obtenida por el programa en cada caso (eje Y). Finalmente, sobre las gráficas, se determina el valor de la concentración del fármaco a la cual se produce una reducción del 50% de la población celular (CI_{50}).

4. Análisis del ciclo celular

La citometría de flujo fue utilizada para determinar la posible variación del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras el tratamiento con TMZ. Para ello se utilizan células tratadas con dosis de IC_{50} de TMZ para cada línea y sin tratar tanto de las líneas basales como de los ciclos de TMZ.

Las células se despegan y se centrifugan durante 5 minutos a 1500 rpm. Tras esto se lavan con PBS y tras volver a centrifugar se fijan con etanol al 70% frío, incubando al menos 5 minutos a 4C. Tras centrifugar nuevamente las células y lavarlas se incubaron con solución de

extracción de DNA (192 ml de Na_2HPO_4 0,2 M y 8ml de ácido cítrico 0,1M, pH 7,8) durante 15 minutos a 37C.

Tras una nueva centrifugación se incubaba con una solución de Ioduro de propidio/RNasa (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNasa, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IP) durante 30 minutos en oscuridad a 37C. Una vez pasada la incubación los datos se analizan utilizando el programa Cellfit en un citómetro de flujo FACScan (BectonDickinson, San Jose, CA, USA).

5. Análisis de proteínas mediante WESTERN BLOT

5.1 Obtención de proteínas

Las células se lavaron 3 veces con PBS para eliminar cualquier resto de medio que pudiera interferir en el western blot. Se despegaron de la superficie de los frascos de cultivo con PBS-EDTA al 0,04% durante 2-3 minutos a 37 °C en estufa de CO_2 . Una vez que las células se despegaron, en la cabina de flujo laminar se añade 1ml/cm² de PBS para recoger las células que fueron centrifugadas las células durante 5 minutos a 1500 rpm. Se repite el proceso añadiendo PBS a los botones, 3 veces. Los sobrenadantes fueron desechados y el botón celular se resuspendió en solución de extracción de proteínas (Trizma base 50 mM, sacarosa 0,25 mM, EDTA 5 mM y tritón 0,5%, pH 7,4) a 4 °C. Una vez resuspendido el pellet fue almacenado a -20°C.

5.2 Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración proteica de las muestras en primer lugar se llevó a cabo una sonicación de las mismas y a continuación se procedió a la cuantificación proteica, utilizando el método de Bradford con una curva patrón de albumina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) de concentraciones conocidas (0,5 μg , 1 μg , 2 μg , 3 μg , 5 μg y 10 μg). La

cuantificación se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en las que se depositan 5 μ l de muestra y se añade 280 μ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.). Se procede del mismo modo con las muestras problema. Se dejó incubar 10 minutos en oscuridad y los resultados se leyeron en un colorímetro (Multiskan Ex Thermo Electron Corporation, Usa) a una longitud de onda de 570 nm. Los valores de densidades ópticas se obtuvieron usando un programa informático "Ascent Software for Multiskan" para Windows v.2,6 (Thermo Labsystems, USA).

5.3 Preparación del gel SDS-PAGE

Para la preparación de los geles, tanto el inferior o "lower" o separador, por el que migran las proteínas en función de su peso molecular, como el superior o "upper", encargado de compactar todas las proteínas para que migren a la vez, se utilizaron las medidas de la tabla.

El tamaño utilizado de los cristales fue de 1mm, y el peine utilizado de 10 o 15 pocillos según el tipo de muestra que se procesó.

	Lower 12%	Upper
Acris/Bis 30%	3,2 ml	0,64 ml
Agua bidestilada	2,8 ml	3,05ml
Buffer Tris 4x 8,8	2ml	
Buffer Tris 4x 6,8		1,25 ml
APS 10%	40 μ l	25 μ l
Temed	4 μ l	5 μ l

- Buffer Tris Lower 4x: 1,5M Tris, SDS 10% en agua destilada y pH 8,8
- Buffer Tris Upper 4x: 0,5M Tris, SDS 10% en agua destilada y pH 6,8

5.4 Preparación de las muestras

Las proteínas fueron disueltas en tampón de carga (Tris-CL 373mM pH 6,8, 12% de SDS, 30% de β -mercaptoetanol, 2ml de glicerol y 0,1% de azul de bromofenol) obteniendo una muestra homogénea que posteriormente fue sometida a calentamiento a 95°C durante 5 minutos para facilitar la acción del SDS rompiendo los puentes disulfuro y conservando a 4°C hasta su utilización. El volumen final de muestra fue de 20 μ l, conteniendo 15 μ g de proteína en un volumen final de 20 μ l, completando con agua bidestilada.

En todos los geles se utilizó un patrón de pesos moleculares (Precision Plus Protein Standards, Kaleidoscope, Bio-Rad).

5.5 Electroforesis

Para la realización de la electroforesis, se colocaron los geles en el soporte destinado a ello en la cubeta de electroforesis rellenando el espacio entre los dos geles con Running buffer (Tris Base 9 g, Glicina 43,2g, SDS 3 g, en agua miliQ). La electroforesis se realizó a voltaje constante y 100 mA durante 120 minutos.

5.6 Transferencia

Finalizada la electroforesis de las proteínas en el gel de agarosa, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, GE Healthcare) mediante el sistema "semiseco", con un aparato Trans blot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad) con tampón de transferencia (Tris base 5,8 g, glicina 2,9 g, metanol 200 ml, SDS 20% en agua miliQ) aunque previamente el gel separador fue equilibrado en tampón de transferencia durante 15 minutos. A continuación, se procedió a la elaboración del sándwich de transferencia, colocando

seriadamente y del polo negativo al positivo los siguientes componentes: papel wathman, gel, membrana de nitrocelulosa y papel whatman. La transferencia se realizó a 20 voltios y a amperaje constante de 100 mA durante 30 minutos.

5.7 Bloqueo e incubación con anticuerpos

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta fue sometida al bloqueo de los sitios inespecíficos mediante una solución de bloqueo rica en proteínas (PBS 1X, 0,1% Tween 20, 5 % leche desnatada en polvo) durante una hora en agitación y temperatura ambiente. A continuación, se retiró la solución de bloqueo, procediéndose a lavar la membrana con PBS-Tween-20 al 0,1 % por tres veces durante 5 min en agitación, añadiendo el anticuerpo primario, a la dilución apropiada, en la solución de bloqueo 1/10 (PBS-Tween-20 0, 1% 9ml, 1ml solución de bloqueo con leche desnatada) e incubando a 4 °C overnight en agitación suave.

Los anticuerpos utilizados se exponen en la siguiente tabla:

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Dilución	Tamaño	Referencia
β -actina	1:10000	40 KDa	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Sc-81178
GADPH	1.10000	37 KDa	Sigma Aldrich G8795
MGMT	1:200	26 KDa	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Sc-56157
Anticuerpos secundarios			
Anticuerpo	Dilución	Conjugado	Referencia
Anti-Ratón IgG	1:2500	HRP (horseradish peroxidase conjugated secondary antibody)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Sc-2005

Previamente a la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana fue sometida a 3 lavados durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente, con PBS-Tween-20 al 0,1%, tras lo cual se adicionó el anticuerpo secundario, a una dilución 1:2500 en solución de bloqueo 1/10, incubando durante 1h a temperatura ambiente en agitación suave.

5.8 Revelado

La detección de la señal se lleva a cabo por quimioluminiscencia (ECL-Plus, GE Healthcare) en el equipo LAS-4000 mini. Los posteriores análisis, así como el tratamiento de la imagen y las cuantificaciones de las bandas, fueron realizados con el programa ImageQuant Las-4000.

6. Extracción de DNA de las líneas celulares

La extracción de DNA se realizó mediante el kit de extracción de DNA Qiagen Mini Kit según las indicaciones del fabricante. Las células se despegaron utilizando PBS-EDTA al 0,04%, durante 2-3 minutos, tal y como se ha descrito anteriormente, fueron lavadas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Al pellet celular se le adicionó 200 μ l de PBS, 20 μ l de proteinasa K junto y 200 μ l buffer de lisis, incubándose durante 15 minutos a 56°C. A continuación, se añadieron 200 μ l de etanol absoluto para precipitar los ácidos nucleicos y que puedan posteriormente quedar retenidos en la membrana de la columna del kit de extracción. La mezcla obtenida se depositó en la comuna que fue centrifugada durante un minuto a 8000 rpm. Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente. Tras eliminar el filtrado se comenzaron los lavados, primero con 500 μ l del buffer AW1 y tras centrifugar en las mismas condiciones anteriores se repitió el lavado con 500 μ l del buffer AW2. Tras centrifugar durante tres minutos a máxima velocidad (14000 rpm) se eliminó el filtrado y se realizó una centrifugación adicional sin nada gracias a la cual se eliminaron los posibles restos de alcohol

de la columna. Para la elución del RNA, se utilizaron 25 µl de agua libre de RNasas. Tras centrifugar un minuto a 10000 rpm el eluido que contiene el RNA de la muestra se cuantifica y se almacena a -20°C.

6.1 Cuantificación del DNA

El RNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech) en dilución 1.100, obteniendo datos de densidad óptica a 280, 260 y 320 así como la ratio de la muestra. En todos los casos se trabajó con muestras con una ratio comprendida entre 1,8 y 2.

6.2 Chequeo mediante electroforesis

Para comprobar la calidad del RNA y ver que no quedaban restos de DNA en la muestra se procedió a cargar 100ng de DNA en un gel de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich) que posteriormente fue visualizado en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories, S.A.)

7. Modificación del DNA mediante Bisulfito Sódico

Ver apartado 4. Modificación del DNA mediante Bisulfito Sódico de la sección Material y métodos en Pacientes

8. PCR específica de metilación del promotor del gen MGMT (MSP)

Ver apartado 5. PCR específica de metilación del promotor del gen MGMT (MSP) de la sección Material y métodos en Pacientes

9. Análisis de alta resolución de la metilación de MGMT (HRM)

El análisis de alta resolución de la metilación (HRM) para MGMT de las muestras de bisulfito, fue realizado por la unidad de genómica del GENyO, Centro de Genómica e Investigación Oncológica de Granada, mediante SYBR® Green de alta sensibilidad para la detección por HRM de la casa comercial Kapa, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Mezcla de Reacción

Componente	Concentración
Master Mix	1x
MgCl ₂	2,5 mM
Primers	0,2 uM
Muestra	5ng
Volumen final	20ul

Condiciones de Reacción

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos, min; segundos, seg)	Nº de ciclos
95	3 min	1
95	5seg	40
60	20-30 seg	
95	10-60 seg	

La reacción se realizó en el equipo Eco Real-Time PCR System (Illumina) donde se almacenaron todos los datos brutos. Éstos datos fueron analizados mediante el software Eco Real-Time PCR System v4.0.

Para realizar la curva de metilación se usaron los controles de la casa qiagen EpiTect Control DNA, methylated y EpiTect Control DNA, unmethylated. Tomando proporciones de metilación: no metilado (0), 0.25, 0.5, 0.75 y totalmente metilado (1).

Todas las muestras, así como la recta patrón se analizaron con dos parejas de primers de la región específica.

10. Extracción de RNA de las líneas celulares

La obtención de ARN total de los cultivos celulares basales y tras los distintos tratamientos a los que han sido sometidos, fue realizada mediante el kit de extracción de RNA Qiagen Mini Kit combinado con la técnica del trizol-cloroformo. Para ello, se añadió 1 ml de trizol a los pellet celulares de cada uno de los falcons de cultivo, homogenizando la muestra con una jeringa de insulina durante 10 veces facilitando la ruptura celular. A continuación, se añadió Cloroformo, vorteadando enérgicamente e incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. La centrifugación a 4°C durante 15 minutos permitió la separación de la fase acuosa en la que se encuentra el RNA, que fue recogida y sometida al protocolo de extracción del kit de qiagen. Todas las centrifugaciones que se lleven a cabo a partir de este punto serán a 4°C.

A la fase acuosa, que contiene el ARN se le adicionó 500 µl de etanol absoluto antes de depositarla en la columna. Esto hace que se precipite el ácido nucleico y quede así retenido en la columna tras centrifugar un minuto a 10000 rpm. Tras la eliminación del sobrenadante se lavó con 700 µl de buffer AW1 y volvió a centrifugarse en las mismas condiciones de la anterior centrifugación. Tras esto se añadieron 500 µl de un segundo buffer de lavado (RPE) y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Después de repetir este último paso para mejorar el lavado del ácido nucleico retenido en la columna se procedió a una centrifugación adicional sin nada gracias a la cual se eliminarán los posibles restos de alcohol de la columna. Para la elución del RNA, se utilizaron 25 µl de agua libre de RNasas. Tras centrifugar un minuto a 10000rpm el eluido que contiene el RNA de la muestra se cuantifica y se almacena a -80°C.

10.1 Cuantificación del RNA

El RNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech) en dilución 1.100, obteniendo datos de densidad óptica a 280, 260 y 320 así como la ratio de la muestra. En todos los casos se trabajó con muestras con una ratio comprendida entre 1,8 y 2.

10.2 Chequeo mediante electroforesis

Para comprobar la calidad del RNA y ver que no quedaban restos de DNA en la muestra se procedió a cargar 100ng de RNA en un gel de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich) posteriormente visualizado en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories, S.A.)

11. Transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa

Utilizando el ARN obtenido previamente se realizó la transcriptasa reversa utilizando 2 µg de RNA total y el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma - Aldrich, Sant Louise, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Mezcla de Reacción

Componente	Concentración
Primer ciclo de RT	
DNTP's	10mM
Oligo(dT)	5µM
RNA	2µg
Volumen total	10µl
Segundo ciclo de RT	
M-MLV buffer	1X
M-MLV enzima	0,5 µl
Inhibidor RNasa	40 unidades/µl
Volumen total	20µl

Condiciones de Reacción

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Primer ciclo RT	
70	10
4	infinito
Segundo ciclo RT	
37	50
4	Infinito

En primer lugar se realizó un primer ciclo de a 70 °C en el que se mezclan los DNTPs, el oligo(dT) y la muestra de RNA (2ug), completando hasta 10 ul con agua libre de RNAsas. Tras esto se realiza un segundo ciclo de PCR a 37°C durante 50 minutos añadiendo al volumen anterior el buffer, la enzima y un inhibidor de RNAsas completando hasta 20ul con agua libre de RNAsas.

Este cDNA se guardó a -20°C hasta su utilización.

12. PCR de expresión de MGMT

Una vez que se tiene el cDNA se realiza una PCR para determinar la expresión de MGMT. Para ello se realizan una PCR utilizando la β -actina como control endógeno utilizando la REDTaqGenomic DNA Polymerase (Sigma - Aldrich, Sant Louise, USA).

Primer		Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
MGMT	Fw	TCACGGCCAGTCCTCCGGAG	259
	Rv	GTTCCCCGTGCCGGCTCTTC	
β -actina	Fw	GGCATCCTCACCTGAAGTA	82
	Rv	AGGTGTGGTGCCAGATTTTC	

La PCR se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante, mezclando los DNTP's, la mezcla de los primers, el buffer de la Taq polimerasa y la muestra hasta completar un volumen de 25 μ l con agua libre de RNAsas. Tras esto se realiza un ciclo de PCR con un ciclo inicial de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos con una temperatura de anillamiento de 58°C. El ciclo final es de extensión y será de 5 minutos a 72°C.

Mezcla de Reacción

Componente	Concentración
DNTP's	200µM
Primer	0,1 µM
Buffer 10X	1X
Muestra	10ng
Taq	0,05 unidades/µl
Volumen final	25µl

Condiciones de Reacción

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos, min; segundos, seg)	Nº de ciclos
94	2 min	1
94	30 seg	30
58	30 seg	
72	2 min	
72	5 min	1
4	Infinito	

El resultado obtenido en esta PCR se cargó en un gel de agarosa al 3% con Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich) y se visualizó en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories, S.A.)

13. Real Time PCR

El cDNA obtenido por retrotranscripción se amplificó mediante PCR a tiempo real en placas de 96 pocillos en el termociclador AppliedBiosystem 7500 (Applied Biosystems, Life Technologies). El volumen total de reacción fue de 20 µl que contienen 20ng de cDNA, 1xTaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Life Technologies), y 1x TaqMan Gene Expression assay (Applied Biosystems, Life Technologies). Los genes amplificados mediante este procedimiento fueron MGMT (Hs01037698_m1, Applied Biosystems, Life Technologies), ABCB1 (Hs00184500_m1 Applied Biosystems, Life Technologies) y CD133 (Hs01009250_m1 Applied Biosystems, Life Technologies) así como un control endógeno GADPH (Applied Biosystems, Life Technologies). El ciclo de PCR utilizado fue 2 minutos a 50°C seguido de 10 minutos a 95°C, y 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 60°C durante 60 s.

Los genes de la Tabla se utilizaron en una PCR a tiempo real tal y como se describe anteriormente pero utilizando Sybergreen (Takara, Clontech Laboratories, Inc. USA)

Primer	Secuencia
MLH1-F	TTC GTG GCA GGG GTT ATT CG
MLH1-R	GCC TCC CTC TTT AAC AAT CAC TT
MSH2-F	GCT GGA AAT AAG GCA TCC AAG G
MSH2-R	CAC CAA TGG AAG CTG ACA TAT CA
MSH3-F	TGG AAA ATG ATG GGC CTG TTA AA
MSH3-R	AGA CAT TCC CAG ATC ACT TCC T
MSH6-F	AGC TTA AAG GAT CAC GCC ATC
MSH6-R	AAG CAC ACA ATA GGC TTT GCC
PMS2-F	GAA GGT TGG AAC TCG ACT GAT
PMS2-R	CGC ACA GGT AGT GTG GAA AA
GADPH-F	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GADPH-R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

El valor Ct de todas las muestras se determinó automáticamente utilizando el software StepOne V2.0 (AppliedBiosystems, Life Technologies). La expresión de los genes se calculó mediante el método ΔCt : $\Delta Ct = \text{valor Ct medio (ARNm referencia)} - \text{valor Ct medio (ARNm de interés)}$. La normalización de los datos se llevó a cabo mediante el Ct del GADPH. La expresión relativa del ARNm de los genes de interés corresponde al valor de $2^{\Delta Ct}$

14. Estudio estadístico

El estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizó con el software estadístico SPSS 15.0 para Windows. En el estudio de los pacientes con glioblastoma multiforme se realizó un análisis descriptivo de las variables recogidas y un análisis de supervivencia con el método de Kaplan Meier, considerando el tiempo desde el diagnóstico hasta la de último seguimiento o muerte. También se crearon distintos subgrupos pronósticos en base a la combinación de diversas variables de interés (metilación de MGMT, sexo, localización del tumor) para los que se compararon las posibles diferencias en la supervivencia global mediante el test de Log-Rank. Para los estudios *in vitro* se realizó un estudio de la t de student.

Resultados

VI. RESULTADOS

ESTUDIOS EN PACIENTES

1. Características clínicas y anatomo-patológicas

Se estudiaron de forma retrospectiva 52 pacientes diagnosticados de gliomas de alto grado entre los años 2000-2011 cuyas características se resumen en la tabla 4.1. Veintidós pacientes eran varones (42,3 %) y treinta mujeres (57,7%). La edad media fue de 54 ± 13 años.

En cuanto a la localización tumoral, en doce pacientes afectaba al lóbulo frontal (23,1%), en diez al parietal (19,2%), en diez al temporal (19,2%), en seis al occipital (11,5%) y en catorce afectaba a más de un lóbulo (26,9%).

Edad		54±13 años	
		Pacientes	Porcentaje
Sexo	Hombre	22	43,2%
	Mujer	30	57,7%
Localización	Frontal	12	23,1%
	Parietal	10	19,2%
	Temporal	10	19,2%
	Occipital	6	11,5%
	Más de 1 lóbulo	14	26,9%

2. Análisis de la supervivencia global de los pacientes

La mediana de supervivencia global fue de 19 meses y la supervivencia media de 22,8 meses. Con respecto al estado actual de los pacientes en el momento de finalizar el estudio, 45 fueron exitus, 5 permanecían vivos con enfermedad y 2 vivos sin evidencia de enfermedad. (Figura 4.2).

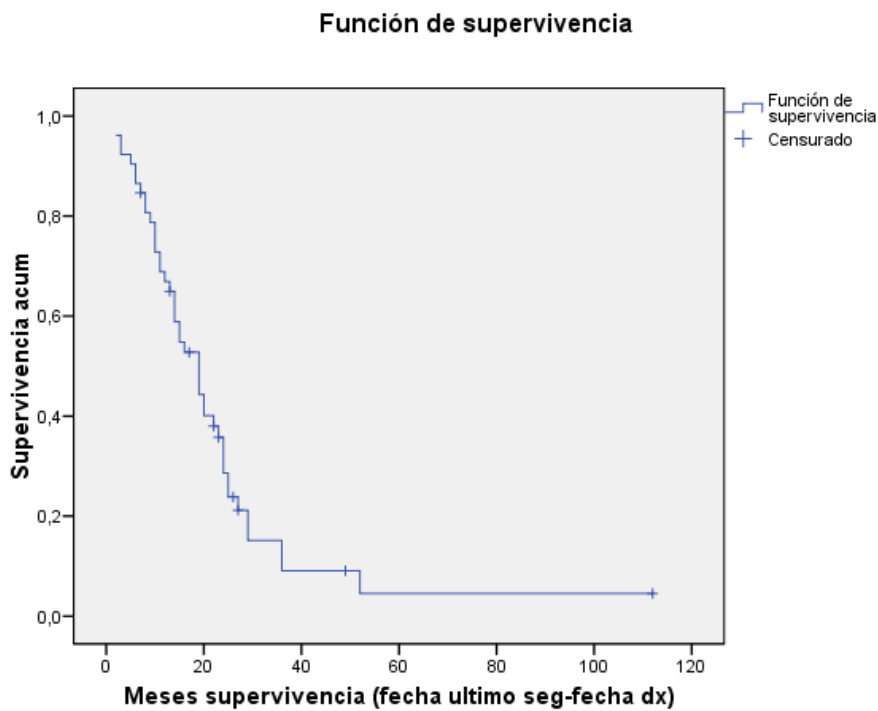


Figura 4.2. Curva de supervivencia global de los 52 pacientes con glioblastoma multiforme

Se realizó un análisis de la supervivencia global según de las variables sexo, edad, y localización del tumor.

Supervivencia global y sexo. No hubo diferencias significativas en función del sexo (Figura 4.3) ni a la localización tumoral (Figura 4.5).

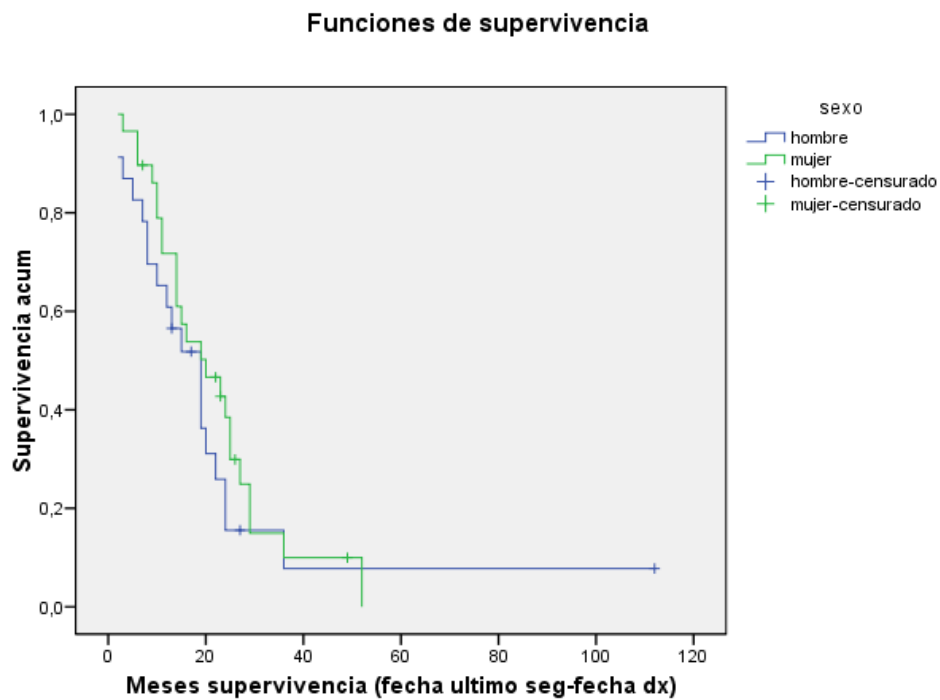


Figura 4.3. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el sexo. * $p=0,465$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia global y edad. El análisis de la curva de supervivencia en función de la edad de los pacientes con glioblastoma multiforme nos permitió determinar la existencia de diferencias significativas en función de la edad, siendo mayor la supervivencia en los pacientes menores o iguales de 50 años), en los que la mediana de supervivencia fue de 40 meses, superior a los 16 meses de los pacientes mayores de 50 años ($p=0,005$) (Figura 4.4).

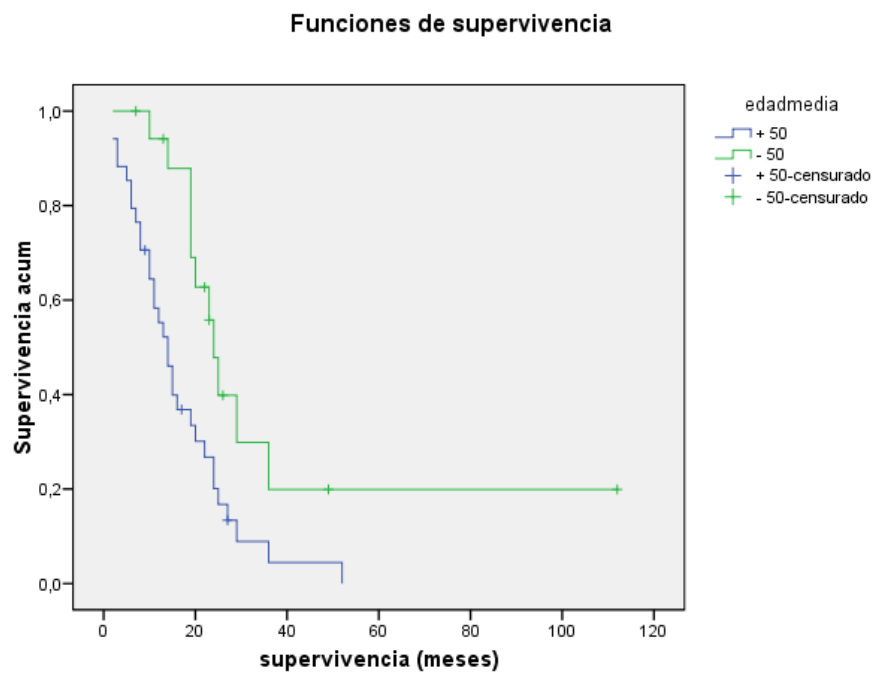


Figura 4.4. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según la edad. * $p=0,005$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

Supervivencia global y localización tumoral. La mediana de supervivencia según la localización tumoral es de 19 meses para una localización frontal y temporal, de 12 meses para una localización parietal, de 15 meses si la localización es occipital y de 20 meses si está localizado en más de un lóbulo. La correlación no fue estadísticamente significativa ($p=0,388$) (Figura 4.5).

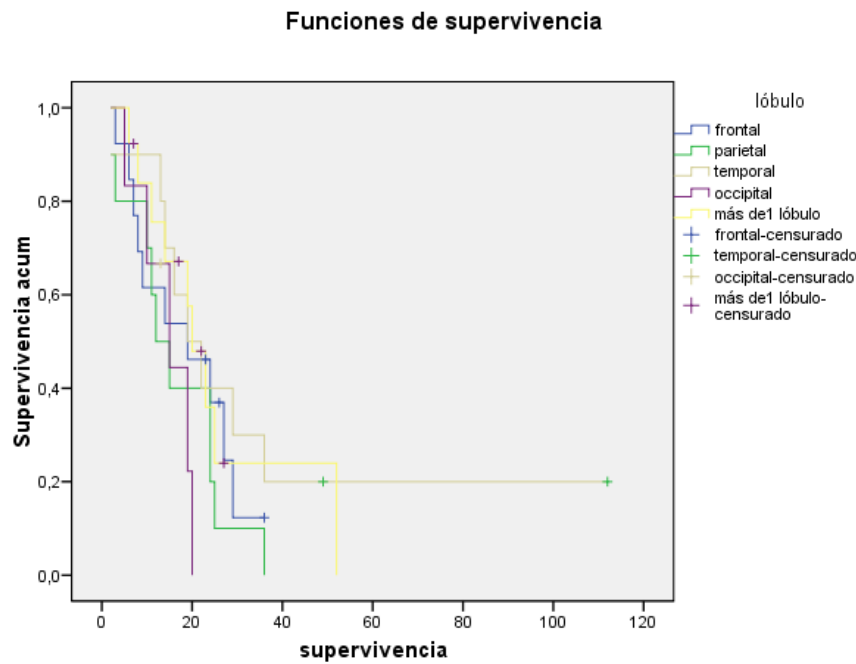


Figura 4.5. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según la localización tumoral. * $p=0,388$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

3. Análisis de la metilación del promotor de MGMT

El análisis de la metilación del promotor del gen MGMT determinó que un 53,8% de los pacientes presentaban metilación de dicho promotor mientras que un 44,2% de los pacientes no tenían metilación de MGMT. En un paciente (2%) no se pudo realizar el estudio por no obtener un ADN de las muestras de parafina de suficiente calidad para realizar el bisulfito y la correspondiente PCR. El resultado obtenido se muestra en la tabla 4.6.

Paciente	Met
P1	-
P4	+
P7	+

Paciente	Met
P2	+
P5	+
P8	+

Paciente	Met
P3	+
P6	+
P9	+

P10	-
P13	+
P16	+
P19	-
P22	+
P25	+
P28	+
P31	+
P34	-
P37	-
P40	+
P43	-
P46	-
P49	-
P52	-

P11	-
P14	+
P17	-
P20	-
P23	-
P26	-
P29	-
P32	+
P35	+
P38	-
P41	-
P44	-
P47	+
P50	+

P12	+
P15	-
P18	-
P21	+
P24	+
P27	+
P30	-
P33	+
P36	-
P39	-
P42	+
P45	+
P48	+
P51	-

Tabla 4.6. Representación de los resultados del estado de metilación del promotor de MGMT en el grupo de pacientes objeto del estudio.

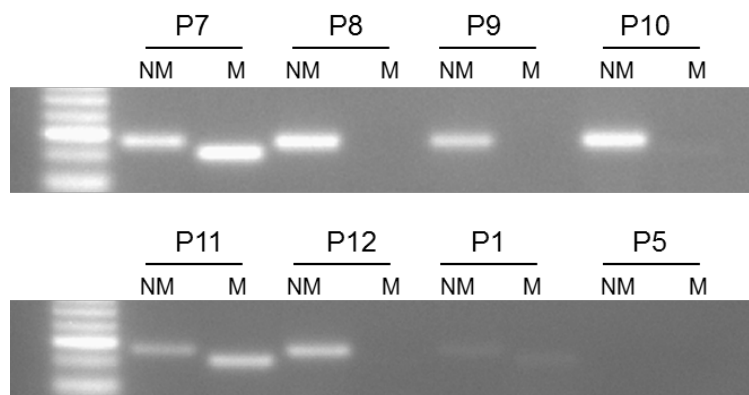


Figura 4.7. Resultados del estudio de metilación (MSP) del promotor de MGMT. U: no metilado, M: metilado, P: paciente sobre el que se ha realizado el análisis.

Supervivencia y metilación de MGMT. La mediana de supervivencia global fue de 15 meses en los pacientes no metilados frente a los 20 meses de los pacientes metilados. El análisis mediante el test de Log-Rank demostró una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables ($p < 0,05$) (Figura 4.8).

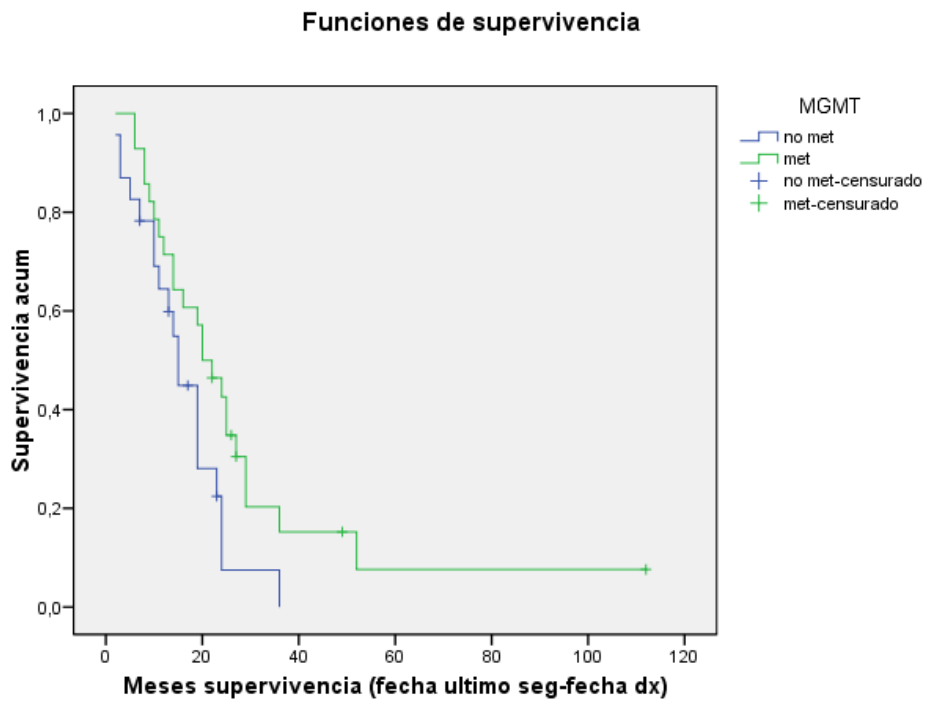


Figura 4.8. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el estado de metilación de MGMT. * $p=0,039$ Test de Log-Rank (Mantel-Cox)

ESTUDIOS A NIVEL CELULAR

1. Estudio de la IC50

1.1. Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) frente a la temozolamida

Tras los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo en todas las líneas celulares, en los que se somete a cada una de ellas a concentraciones crecientes de TMZ, tal y como se describe en el apartado de material y métodos, se obtiene la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀). Los resultados obtenidos para las líneas basales se reflejan en la siguiente figura (figura 4.9).

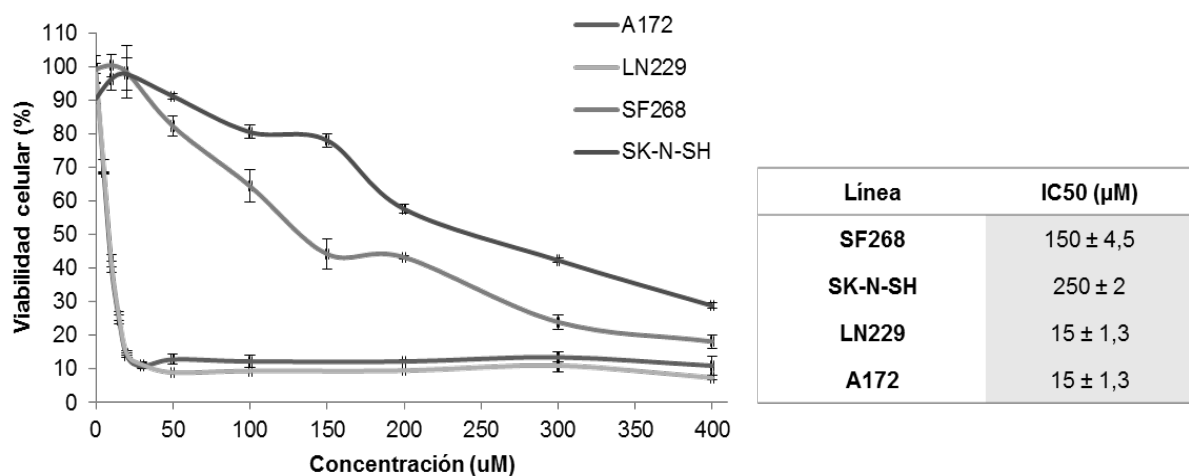


Figura 4.9. IC₅₀ de las líneas celulares expuestas a dosis crecientes de TMZ, determinada mediante la técnica de Sulforrodamina-B. Los valores representan la media ± S.D. de tres estudios independientes.

En esta figura se observan diferencias significativas en la IC₅₀ frente a la TMZ obtenida para cada una de las líneas de estudio. Los resultados obtenidos muestran una IC₅₀ muy elevada para las líneas SF268 y SK-N-SH de 150 y 250 µM respectivamente mientras que en las

líneas LN229 y A172 la dosis inhibitoria 50 fue de 15 μM . Estos resultados nos han permitido llevar a cabo un estudio con líneas celulares que presentan un comportamiento diferente al ser expuestas a TMZ, dos de estas líneas presentan una IC_{50} igual o superior a 150 μM (SF268 y SK-N-SH) por lo que las consideraremos como líneas resistentes a TMZ mientras que las otras dos líneas presentan una IC_{50} inferior a 50 μM (LN229 y A172), por lo que pueden ser consideradas como líneas sensibles a TMZ.

1.2. Concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) tras la exposición a ciclos de temozolamida

Para valorar la respuesta a una exposición continuada de TMZ, acercándonos al tratamiento administrado a los pacientes con glioblastoma, las líneas celulares fueron expuestas durante uno y dos ciclos a TMZ, determinando la posible modificación en los valores de la IC_{50} . Los resultados obtenidos, tal y como se muestran en la figura 4.10, varían según la línea celular objeto de estudio.

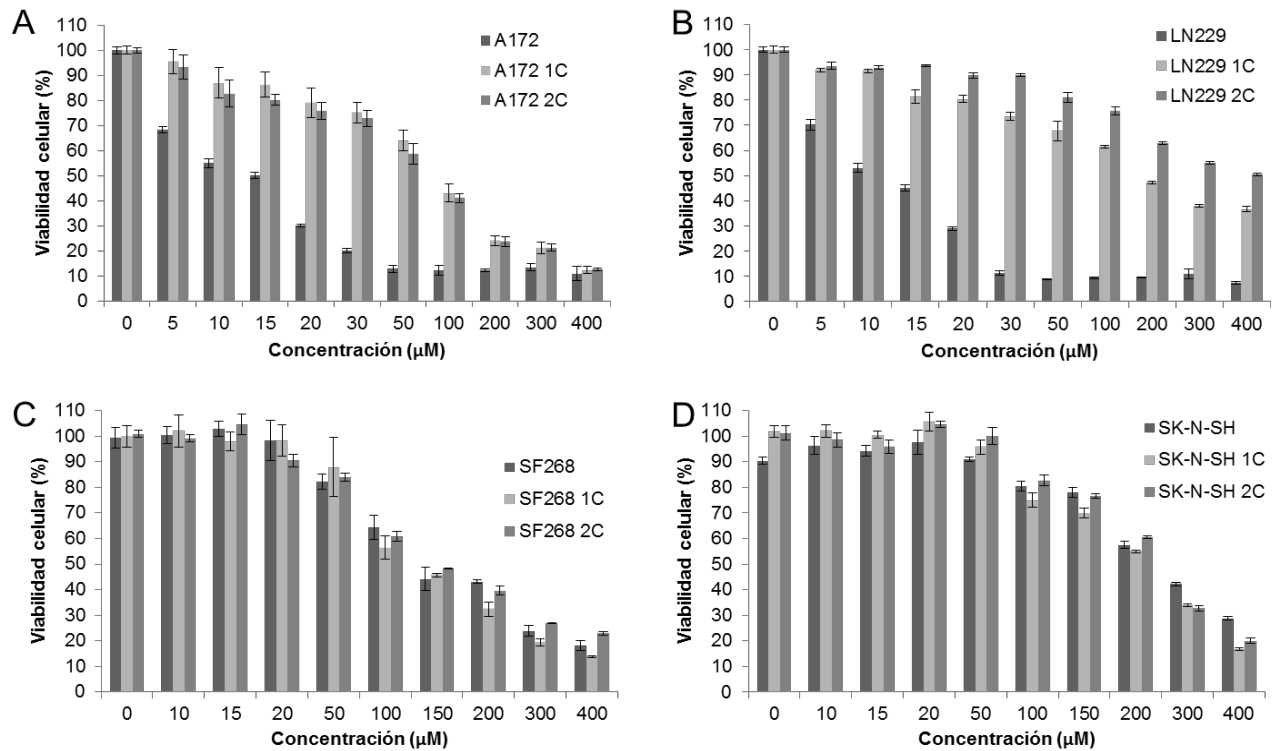


Figura 4.10. Gráficas de proliferación celular de las líneas, A172 (A), LN229 (B), SF268 (C) y SK-N-SH (D), sometidas a la exposición de dosis crecientes de temozolamida (TMZ) para obtener una concentración inhibitoria 50. Las gráficas muestran la viabilidad celular de las líneas basales (A172, LN229, SF268 y SK-N-SH) y de las líneas tratadas con TMZ durante uno o dos ciclos (1C, 2C). Los valores representan la media \pm S.D. de tres estudios independientes

Los resultados muestran como en las líneas que presentaban una mayor IC_{50} basal (resistentes), la concentración inhibitoria 50 no se modificó con los ciclos de TMZ, siendo de 150 μ M para la línea SF268 y de 250 μ M para la línea SK-N-SH (figura 4.10-CD). Sin embargo, en el caso de las líneas LN229 y A172 (sensibles), que presentaban una baja IC_{50} basal, los ciclos con TMZ, indujeron importantes modificaciones, incrementando sucesivamente con cada uno de los ciclos la resistencia a la TMZ, En la línea LN229 la IC_{50} incrementó de 15 μ M a 200 μ M tras

la exposición al primer ciclo, alcanzando una IC_{50} de 400 μ M tras el segundo ciclo de exposición a TMZ ($p < 0,05$) (figura 4.10-B). Resultados similares se obtuvieron con la línea A172, en la que la IC_{50} incrementó significativamente ($p < 0,05$) de 15 μ M a 80 μ M tras el primer ciclo aunque no se modificó tras la exposición al segundo ciclo de TMZ (figura 4.10-A).

2. Estudio del ciclo celular

Para analizar el punto del ciclo celular en el que se encuentran las células y como se modifica tras el tratamiento con TMZ se realizó una citometría de flujo para determinar el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular y para analizar el proceso apoptótico sufrido por estas células tras los ciclos de TMZ.

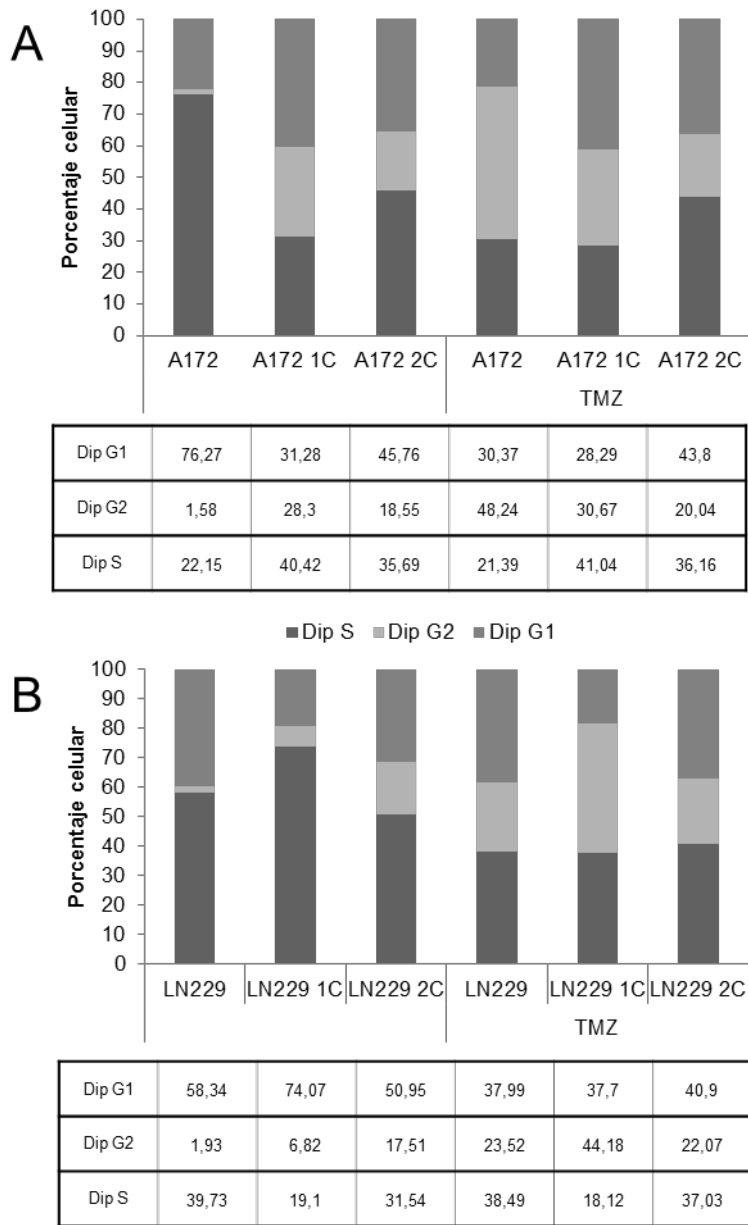


Figura 4.11-1. Análisis del ciclo celular de las líneas A172 y LN229 basales (A) y tras la exposición durante dos ciclos a TMZ (B). Los valores representan la media \pm S.D. de tres estudios independientes.

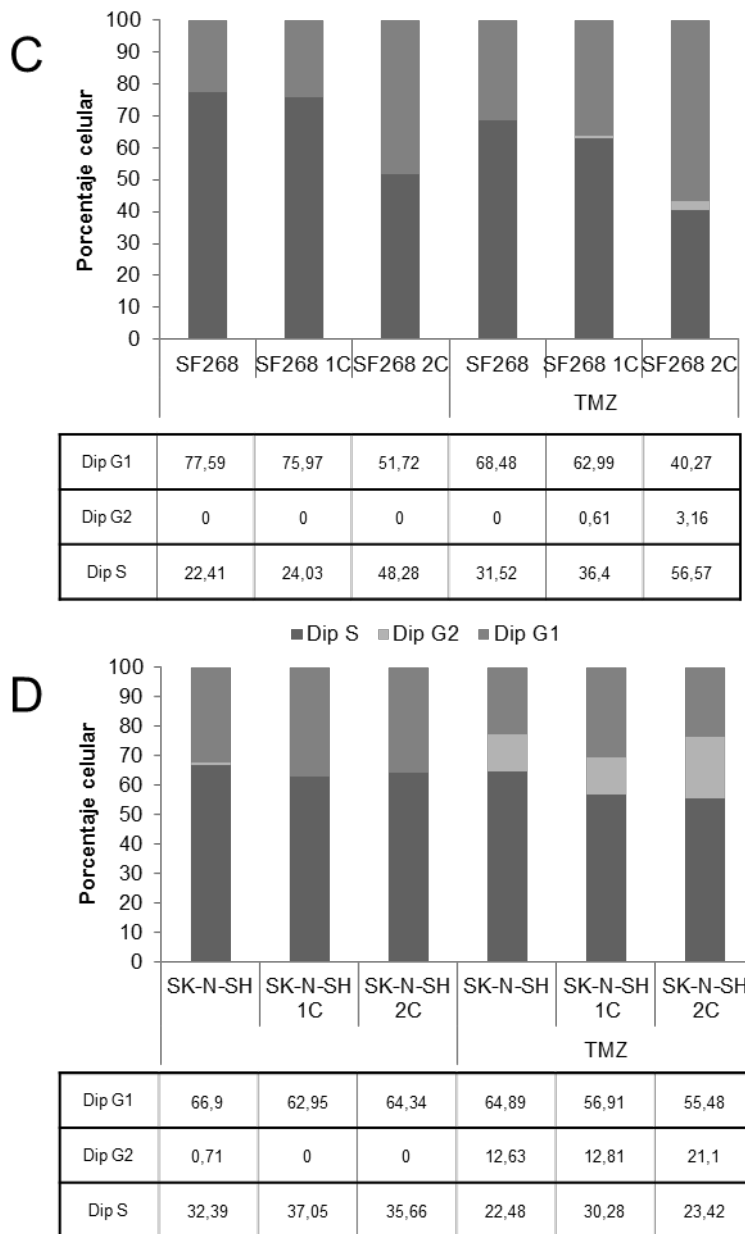


Figura 4.11-2. Análisis del ciclo celular de las líneas SF268 y SK-N-SH basales (C) y tras la exposición durante dos ciclos a TMZ (D). Los valores representan la media \pm S.D. de tres estudios independientes.

En todas las líneas de estudio se compararon los resultados obtenidos tras el análisis de la citometría de flujo en el estado basal de la línea y tres días después de la administración de la TMZ. Los resultados muestran un comportamiento parecido en las líneas A172 y LN229 (figura 4.11-1) en el que se puede ver una tendencia a un aumento de la fase G2 reduciéndose

la fase S. En el caso de la línea A172 basal (figura 4.11-1A) se observa un incremento de un 46% de la fase G2 tras el tratamiento con TMZ. A la hora del análisis de los ciclos de TMZ, vemos que en relación al estado basal sin tratamiento existe un incremento de un 20% de la fase G2. El incremento en esta fase se mantiene cuando añadimos TMZ a los ciclos aunque no es tan acusado como en los casos anteriores, siendo de solo un 2%. En la línea LN229 (figura 4.11-1B) el comportamiento es similar dándose un incremento de un 20% en G2 en el estado basal tras la administración de TMZ aunque el incremento tras el primer ciclo ronda un 40%.

En el caso de las líneas SF268 y SK-N-SH (figura 4.11-2) lo que se observa es una casi inexistencia de fase G2 cuando no se realiza el tratamiento con TMZ y una leve parada en G2 cuando se le administra la TMZ llegando a niveles de un 3% en el caso de la línea SF268 (figura 4.11-2C) tras el segundo ciclo de TMZ. Esta parada en G2 es un poco más acusada en la línea SK-N-SH (figura 4.11-2D) en la que tras la administración de TMZ el porcentaje de células en G2 aumenta entre un 12 y un 20%.

3. Análisis de MGMT

3.1. Metilación de MGMT en las líneas celulares basales

Debido a que la expresión de la enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT) se encuentra regulada epigenéticamente por la metilación del promotor del gen que la codifica, se realizó un estudio de metilación del promotor en las diferentes líneas objeto de estudio (figura 4.12). Esto se realizó mediante la técnica de PCR específica de promotor (MSP-PCR) a partir de DNA genómico sometido a un tratamiento con bisulfito sódico. Los resultados obtenidos para las líneas SF268 y SK-N-SH fueron de una presencia simultánea de ambas bandas, metilada y no metilada. Por el contrario, en las líneas sensibles, A172 y LN229, sólo se

amplificaba la banda de metilado, por lo que estas líneas presentan una metilación prácticamente total las islas CpG del promotor del gen que codifica para la enzima MGMT.

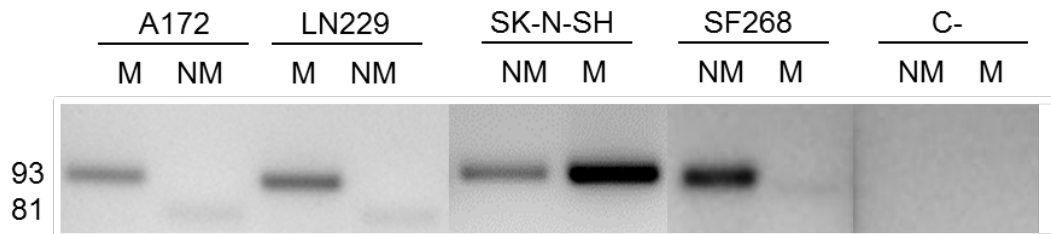


Figura 4.12. Estado de metilación del promotor de MGMT en las líneas A172, LN229, SF268 Y SK-N-SH mediante MSP-PCR. M: Metilado, NM: no metilado, C-: control negativo.

3.2. Metilación de MGMT en las líneas celulares tras la exposición a los ciclos de TMZ

Tras determinar mediante MSP-PCR el estado de metilación de las líneas basales, realizamos una técnica de cuantificación del porcentaje de metilación de las líneas tras los diferentes ciclos de TMZ. Los resultados obtenidos en este estudio mostrados en la figura 4.13 indican que las líneas A172 y LN229 que carecen de expresión basal de MGMT, tienen su promotor metilado totalmente en el caso de LN229 y entre un 75-100% en el caso de A172. Después de la exposición a TMZ, la línea A172 presenta un 100% de metilación del promotor de MGMT que se mantiene tras el segundo ciclo. En la línea LN229, el tratamiento con TMZ permite en el segundo ciclo una leve disminución del nivel de metilación que alcanza entre el 75-100% de las islas CpG del promotor del gen MGMT. En cambio, las líneas SF268 y SK-N-SH sufren mayores variaciones con respecto al estado de metilación del promotor de MGMT, siendo estas más acusadas en la línea SK-N-SH, en la que se observa una tendencia a la disminución de la metilación conforme se incrementan los ciclos con TMZ, observando tras el

primer ciclo un nivel de metilación del 25-50% y tras el segundo ciclo una metilación del 0-25% mientras que en la línea basal el nivel de metilación del promotor de MGMT es del 75%. En la línea SF268, el estado de metilación se mantiene constante tras el segundo ciclo con TMZ respecto a la línea basal (50-75%) y sólo se aprecia un ligero incremento tras la administración del primer ciclo de tratamiento, con un 75% de metilación del promotor de MGMT.

	% Metilación								
	0	0-25	25	25-50	50	50-75	75	75-100	100
A172									
A172 1C									
A172 2C									
LN229									
LN229 1C									
LN229 2C									
SF268									
SF268 1C									
SF268 2C									
SK-N-SH									
SK-N-SH 1C									
SK-N-SH 2C									

Figura 4.13. Representación del porcentaje de metilación del promotor de MGMT en el estado basal de las líneas A172, LN229, SF268 y SK-N-SK y tras los sucesivos ciclos con temozolamida.

3.3. Evolución de la expresión de la enzima MGMT durante la exposición a la TMZ

Para analizar la modificación de la expresión de la enzima de reparación MGMT a lo largo del tratamiento con TMZ, se realizó un estudio mediante la técnica de Western Blot a partir de las proteínas totales de las líneas que presentaban un alto porcentaje de islas CpG del promotor no metilado, un 50% en SF268 y entre un 50% y un 75% en SK-N-SH. El estudio fue

llevado a cabo en las líneas, anteriormente mencionadas, sometidas a un tratamiento con TMZ a una dosis IC_{50} . La expresión de la enzima se analizó a las 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h de la exposición a TMZ y los resultados obtenidos, en ambas líneas analizadas muestran una progresiva disminución hasta las 24 horas que es compensada e incrementada desde las 72 horas hasta el final del tratamiento a las 144h (figura 4.14)

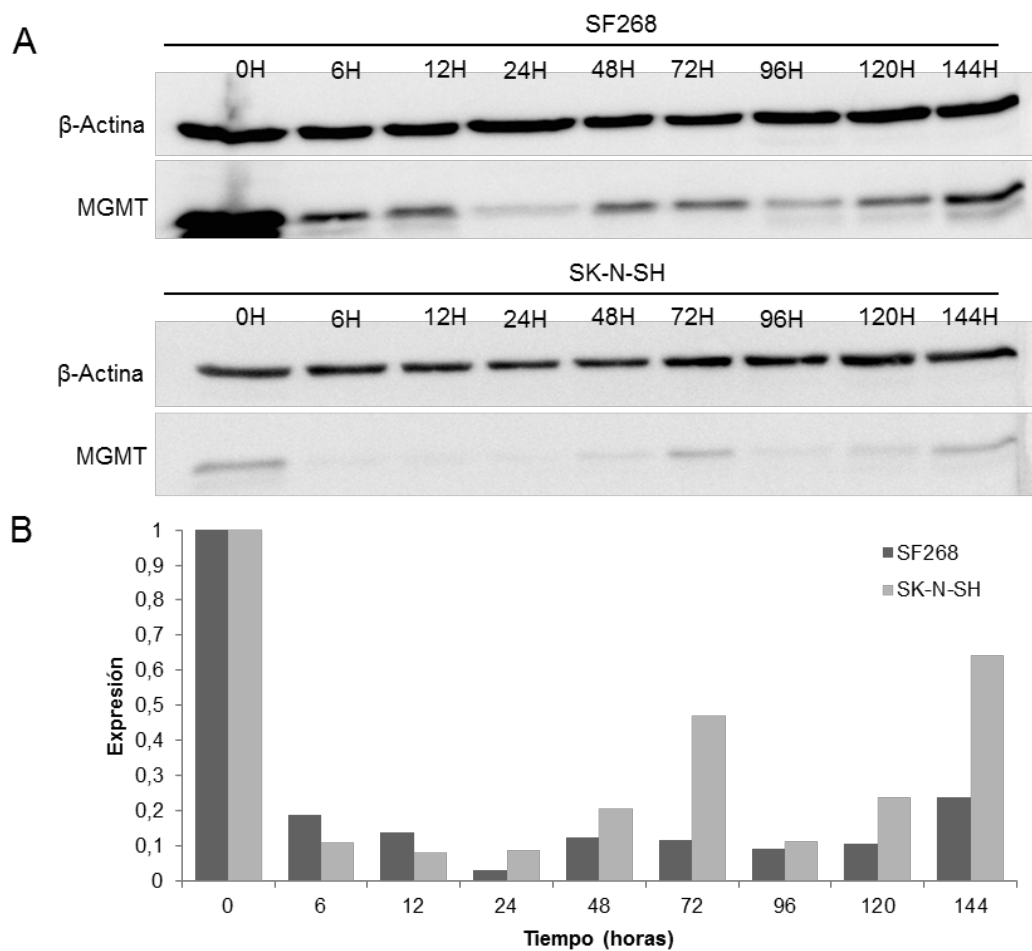


Figura 4.14. Estudio mediante western blot de la expresión proteica de MGMT en las líneas, SF268 y SK-N-SH. Modificación de la expresión de MGMT durante el tratamiento con TMZ a dosis IC_{50} en las líneas SF268 y SK-N-SH, a las 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h. (A); Densitometría de las bandas de expresión de MGMT para las líneas SF268 y SK-N-SH (B).

En el caso de las líneas LN229 y A-172, que presentan una hipermetilación de las islas CpG del promotor de MGMT (100% y 75-100% respectivamente) los niveles basales de expresión de la enzima MGMT fueron tan bajos que no pudieron detectarse a tiempos pequeños de exposición a TMZ, mediante Wester Blot (datos no mostrados). Tras la exposición a dos ciclos de tratamiento con TMZ, los niveles de MGMT tampoco pudieron detectarse mediante esta técnica en las líneas A172 y LN229 (figura 4.15-A), mientras que en el caso de SF268 y SK-N-SH si se observa un aumento significativo de la expresión de MGMT (figura 4.15-B). Este incremento es de 4 y 3 veces mayor tras la exposición al segundo ciclo de TMZ en las líneas SF268 y SK-N-SH respectivamente (figura 4.15-C).

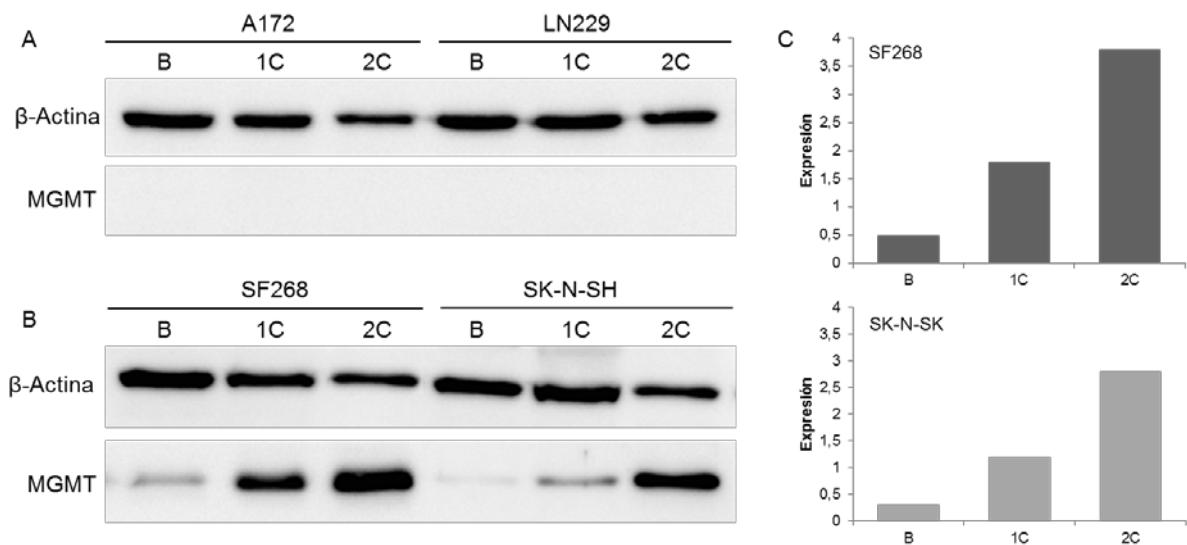


Figura 4.15. Estudio a nivel proteico de la variación de expresión de MGMT durante los ciclos con temozolamida en líneas sin expresión basal de MGMT, A172 Y LN229 (A) y en líneas con elevada expresión basal de MGMT, SF268 y SK-N-SH (B). Análisis densitométrico de la expresión proteica del enzima MGMT en las líneas SF268 y SK-N-SH (C).

El estudio para determinar los niveles de ARNm de MGMT en las líneas se llevó a cabo también mediante PCR a tiempo real. Los resultados de la figura 4.16-A, muestran que los niveles basales de ARNm de MGMT determinados mediante PCR a tiempo real son elevados en las líneas SF268 y SK-N-SH, siendo la línea SK-N-SH la que más expresa, con casi el doble de expresión de ARNm de MGMT que SF268. La exposición a dosis IC_{50} de TMZ de estas líneas durante 144 h corroboró los datos obtenidos en western blot con una disminución a las 24 horas y tras esto una recuperación progresiva hasta el final del tratamiento (figura 4.16-B). Por el contrario, las líneas de A172 y LN229 no presentaban niveles detectables de ARNm o lo hacían en niveles muy bajos como es el caso de la línea A172 (figura 4.16-A).

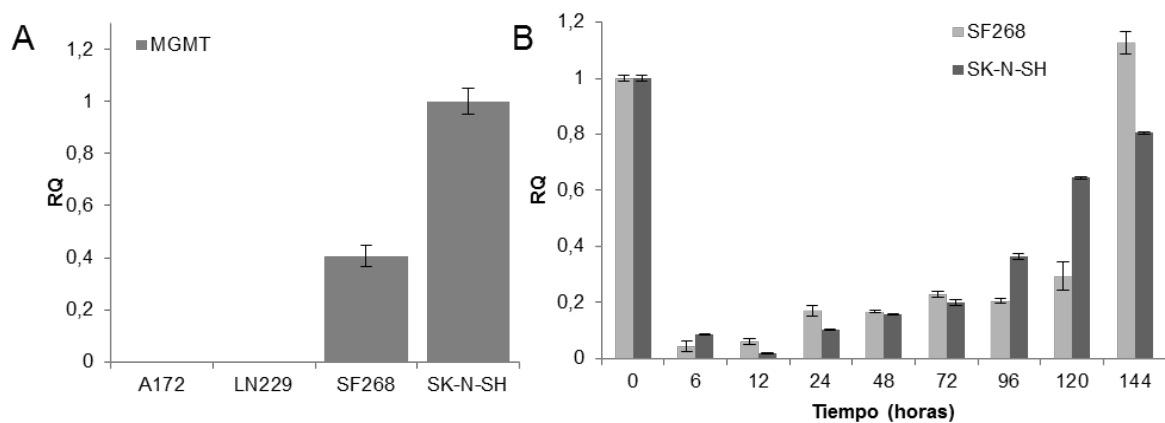


Figura 4.16. A) Estudio de la expresión de MGMT en las líneas A172, LN229, SF268 y SK-N-SH mediante estudios de PCR a tiempo real. B) Variación de la expresión de ARNm del gen MGMT durante el tratamiento con la dosis IC_{50} de TMZ en las líneas SF268 y SK-N-SH a diferentes tiempos de exposición.

Tras la exposición a los dos ciclos de TMZ se obtuvieron resultados diferentes para cada una de las líneas celulares analizadas y dentro de las mismas, diferencias de expresión respecto a la situación basal de partida.

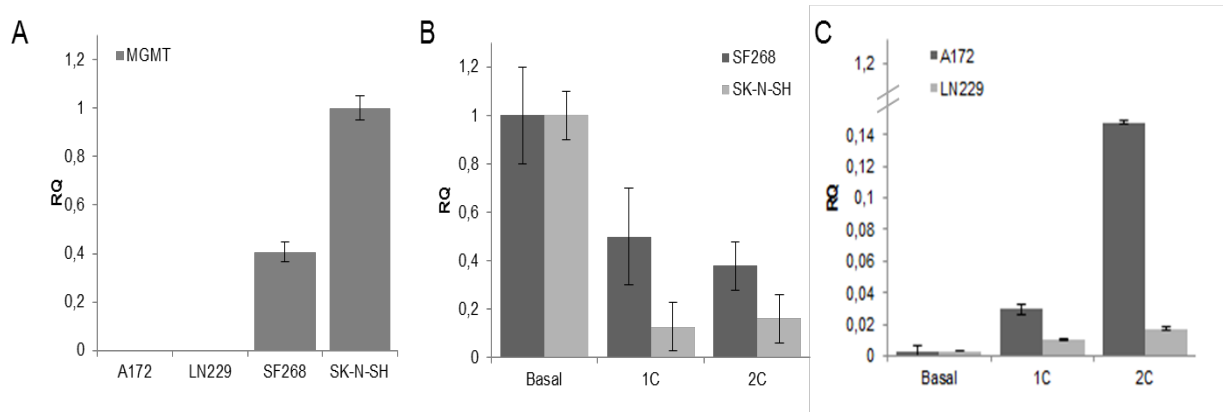


Figura 4.17. Estudio de la expresión del ARNm del gen MGMT en las líneas A172, LN229, SF268 y SK-N-SH, en el estado basal (A) y tras los ciclos de TMZ en las líneas con expresión basal de MGMT, SF268 y SK-N-SH (B) y en las líneas sin expresión basal de MGMT, A172 Y LN229 (C).

Como se puede observar en la figura 4.17-B, tras situar como referencia el valor de la expresión de la línea basal, los resultados muestran como en el caso de las líneas SF268 y SK-N-SH, que presentaban un alto nivel de ARNm de MGMT basal, se produjo una disminución drástica de la misma: en el caso de SK-N-SH superior al 80% tras el primer ciclo con un ligero incremento, estadísticamente no significativo, en el segundo; en la línea SF268 también se produce un descenso, del 50% en los niveles de ARNm de MGMT, al 60% en primer y segundo ciclo respectivamente. Por el contrario, en aquellas líneas que no existe apenas expresión a nivel del ARNm de MGMT en el estado basal (figura 4.17-C), se incrementa su expresión respecto a los niveles basales de las líneas en 6 veces más que la basal en el segundo ciclo de TMZ en la línea LN229, y de 50 veces en A172. A pesar de estos incrementos del nivel de transcripción en las líneas sensibles respecto a su estado basal, la expresión tras los ciclos no alcanza la expresión que presentan las líneas resistentes, SF268 y SK-N-SH (figura 4.17-A).

3.4. Análisis de la implicación de MGMT como mecanismo de resistencia a TMZ de las líneas celulares de glioblastoma

Para determinar si el nivel de expresión de la enzima MGMT es el responsable de la mayor resistencia o sensibilidad a la TMZ que presentan las distintas líneas celulares se procedió en primer lugar a adicionar 5-Aza-2'-deoxicitidina, agente desmetilante del ADN, para eliminar la metilación del promotor del gen que codifica para la enzima MGMT para conseguir la expresión de MGMT en las líneas LN229 y A172 que presentan baja o nula expresión basal y la sobreexpresión de MGMT en las líneas SF268 y SK-N-SH, que presentan una alta expresión basal de esta enzima

En segundo lugar, se procedió a silenciar la expresión de dicha enzima en las líneas SF268 y SK-N-SH que presentaban una alta expresión de MGMT, utilizando para ello O6-Benzilguanina (O6BG).

3.4.1. Determinación de la IC₅₀ tras la sobreexpresión de MGMT con 5-Aza-2'-deoxicitidina

Para la determinación de la IC₅₀ se realizó un pretratamiento de tres días con una concentración de 10µM de 5-Aza-2'-deoxicitidina en las líneas que no expresan MGMT y un pretratamiento de dos horas con una concentración de 5µM en las que si expresan MGMT. La toxicidad de ambas dosis fue comprobada con anterioridad al estudio no siendo tóxica ninguna de ellas en las líneas empleadas (figura 4.18). La inducción de la expresión de MGMT en cada una de las líneas fue analizada mediante Western Blot en las líneas SF268 y SK-N-SH, observando un incremento de los niveles basales de un 20 y 50% respectivamente (figura 4.19-B). En el caso de las líneas LN229 y A172, en los que la expresión basal era tan baja que no podía detectarse mediante western blot, llevamos a cabo el estudio mediante RT-PCR que nos

mostró un incremento de los niveles de ARNm de MGMT de un 20 y 40% en las líneas A172 y LN229 respecto de sus niveles basales (figura 4.19-A).

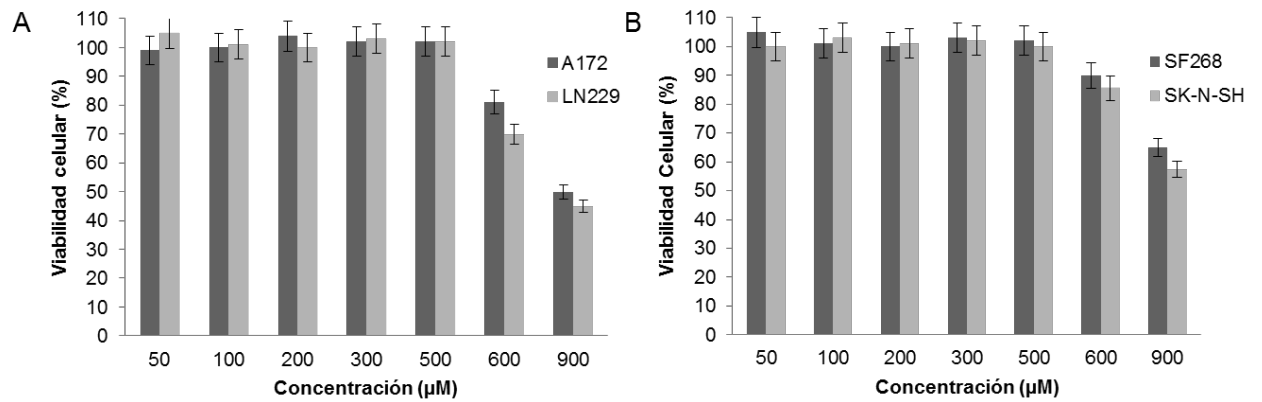


Figura 4.18. Estudio de toxicidad de la 5-Aza-2'-deoxicitidina en las líneas A172, LN229 (A) SF268 y SK-N-SH (B). Los valores representan la media \pm S.D. de tres estudios independientes.

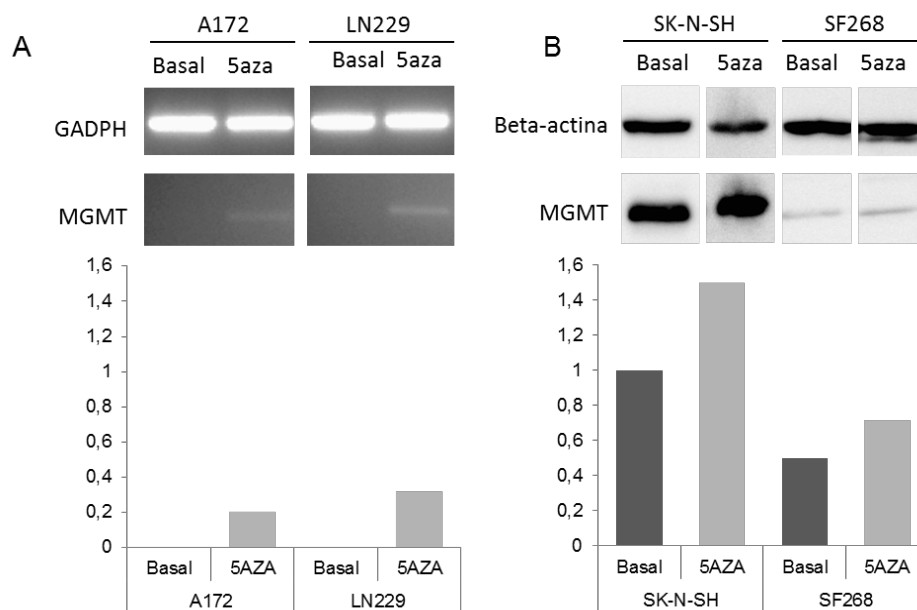


Figura 4.19. Determinación mediante RT-PCR de la expresión de MGMT tras el tratamiento con 5-Aza-2'-deoxicitidina en las líneas A172 y LN229 con su respectiva densitometría (A). Determinación de la sobre expresión de MGMT en las líneas SF229 Y SK-N-SH, por Western Blot tras el tratamiento con 5-Aza-2'-deoxicitidina con su respectiva densitometría (B).

Tras comprobar que efectivamente se producía un aumento de la expresión de MGMT se procedió a la realización del estudio de citotoxicidad con TMZ. Este análisis, nos permitió observar un incremento de la IC_{50} tras el pretratamiento con 5-Aza-2'-deoxicitidina en las líneas que no expresaban MGMT, siendo mayor en la línea A172, en la que la IC_{50} prácticamente incrementaba en un 50%, pasando de 15 μ M en la línea basal a 30 μ M en la pretratada con 5-Aza-2'-deoxicitidina. En el caso de la línea LN229, este incremento fue menor, siendo de 20 μ M en la línea pretratada frente a 15 μ M en la no tratada (figura 4.20-A). Sin embargo, en aquellas líneas que presentaban una alta expresión basal de MGMT, SF268 y SK-N-SH, el tratamiento con el agente desmetilante no provocó modificaciones en sus respectivas IC_{50} (figura 4.20-B).

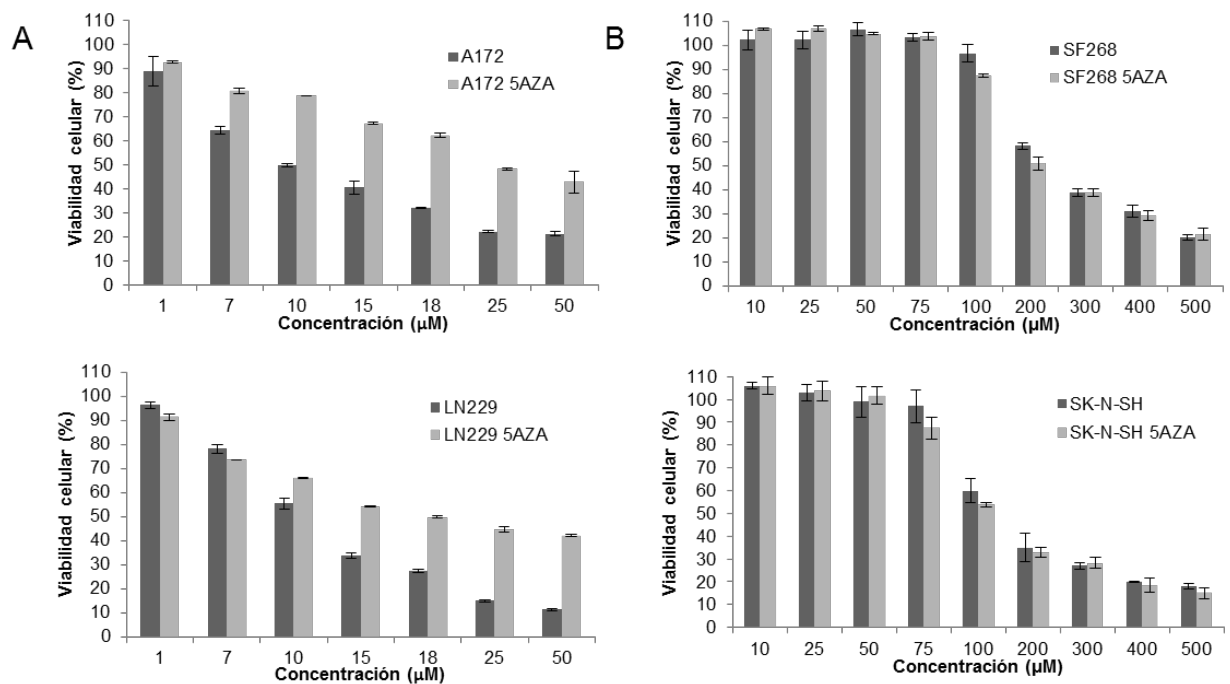


Figura 4.20. Estudio de la IC_{50} de las líneas A172, LN229, SF268 y SK-N-SH tras un pretratamiento con 5-Aza-2'-deoxicitidina en el que se puede observar un incremento de la IC_{50} en las líneas A172 y LN229 (A) mientras que no se aprecia variación en las líneas SF268 y SK-N-SH (B). Los valores representan la media \pm S.D. de tres estudios independientes.

3.4.2. Determinación de la IC₅₀ tras la inhibición de MGMT con O6-Benzilguanina

Con objeto de inhibir la expresión de la enzima MGMT en las líneas celulares SF268 y LN229, que presentan una alta expresión de esta enzima, realizamos un estudio para seleccionar la dosis y el tiempo de administración de O6-benzilguanina que no siendo tóxica fuese capaz de mantener la inhibición de la expresión de MGMT durante todo el tratamiento con TMZ (figura 4.21).

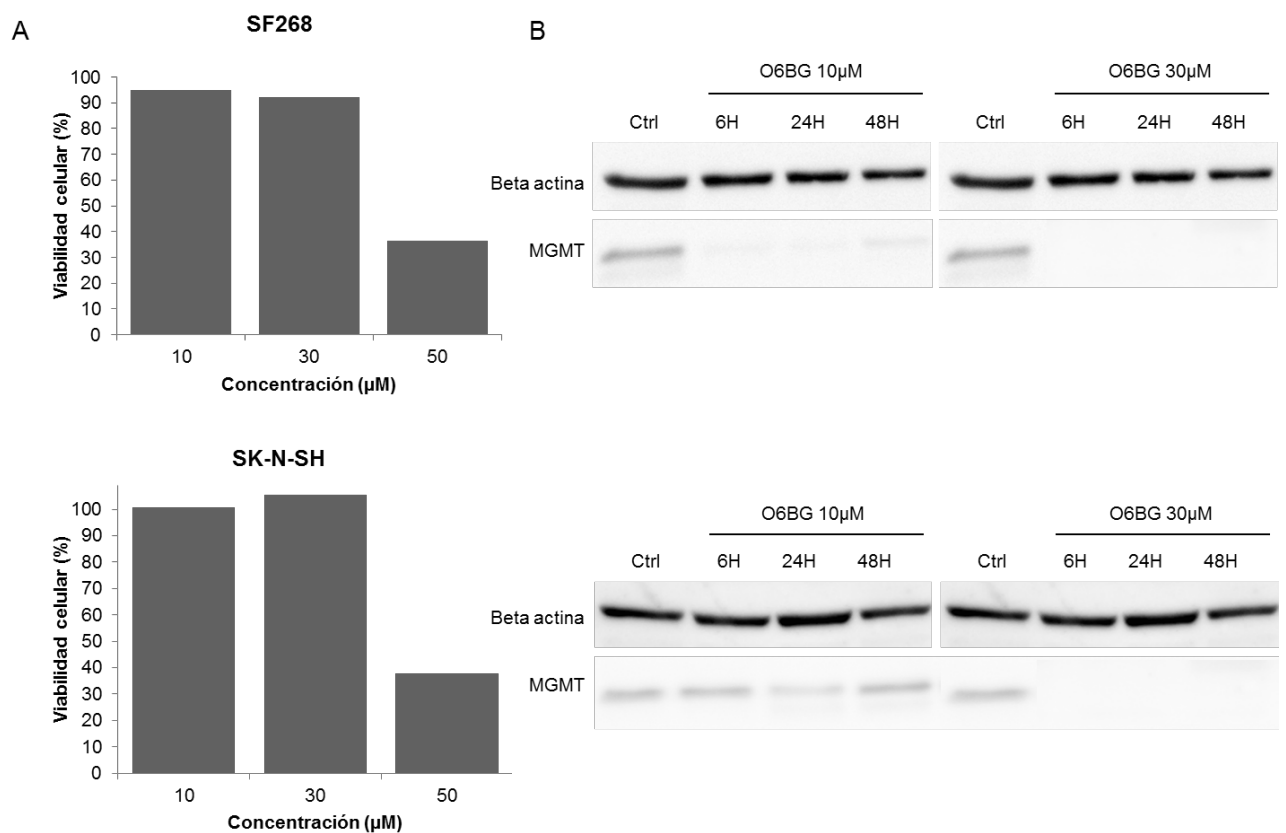


Figura 4.21. Análisis de toxicidad de O6BG en las líneas SF268y SK-N-SH (A).Determinación mediante western blot de los niveles de expresión de MGMT tras el tratamiento de dos horas con una concentración 10 y 30 µM de O6BG a 6, 24 y 48 horas (B).

Una vez demostrado que la administración de una dosis 30 μM de O6BG durante dos horas inhibía completamente la expresión de MGMT (figura 4.22-A), determinamos la IC_{50} de TMZ en las líneas SF268 y SK-N-SH (figura 4.22-B). Los resultados obtenidos demuestran que no se produjeron modificaciones estadísticamente significativas entre las IC_{50} basales de estas líneas frente a TMZ y las obtenidas tras el pretratamiento con O6BG.

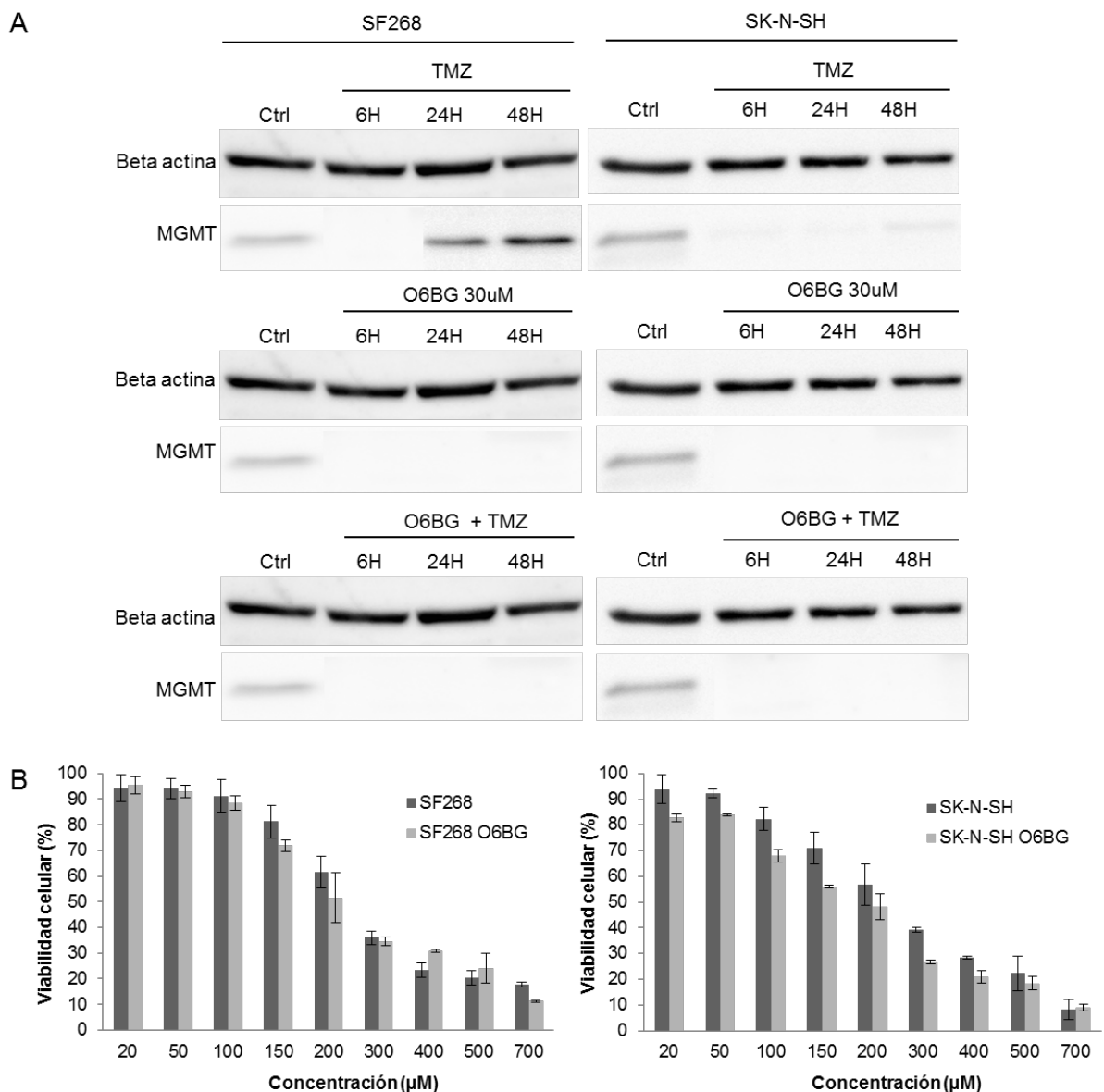


Figura 4.22. Determinación mediante western blot de la inhibición de MGMT tras el tratamiento con O6BG en las líneas SF268 y SK-N-SH (A) representando la expresión de MGMT tras el tratamiento con TMZ, cuando se administra solo O6BG y tras la coadministración de TMZ y O6BG. Representación gráfica

de la variación de la IC_{50} en las líneas SF268 y SK-N-SH (B) tras un pretratamiento con O6BG. Los valores representan la media \pm S.D. de tres estudios independientes.

4. Análisis de MMR

4.1. Análisis de la expresión basal de MMR en las líneas celulares y tras la exposición a TMZ

El estudio del sistema de reparación de errores en el DNA (DNA Mismatch repair system, MMR) se llevó a cabo en todas las líneas de estudio mediante el análisis de la expresión de su ARNm. Para ello, tras la extracción de ARN celular se realizó una PCR a tiempo real con los primers detallados en el apartado de material y métodos para cada gen de estudio. Los resultados obtenidos (figura 4.23-A) muestran una diferencia de expresión de ARNm entre las líneas con bajas y elevadas IC_{50} frente a TMZ. Las más sensibles a TMZ, que no expresan MGMT de forma basal, A172 y LN229, son las que tienen mayor expresión de MMR, mientras que aquellas líneas con alta expresión basal de MGMT, con una elevada IC_{50} frente a TMZ, SF268 y SK-N-SH, prácticamente no tienen expresión de MMR.

El tratamiento con TMZ de las líneas analizadas, permitió demostrar que tras la administración de los dos ciclos de TMZ se produce un cambio en la expresión de MMR que es independiente de la sensibilidad o resistencia de cada una de las líneas frente a la temozolamida.

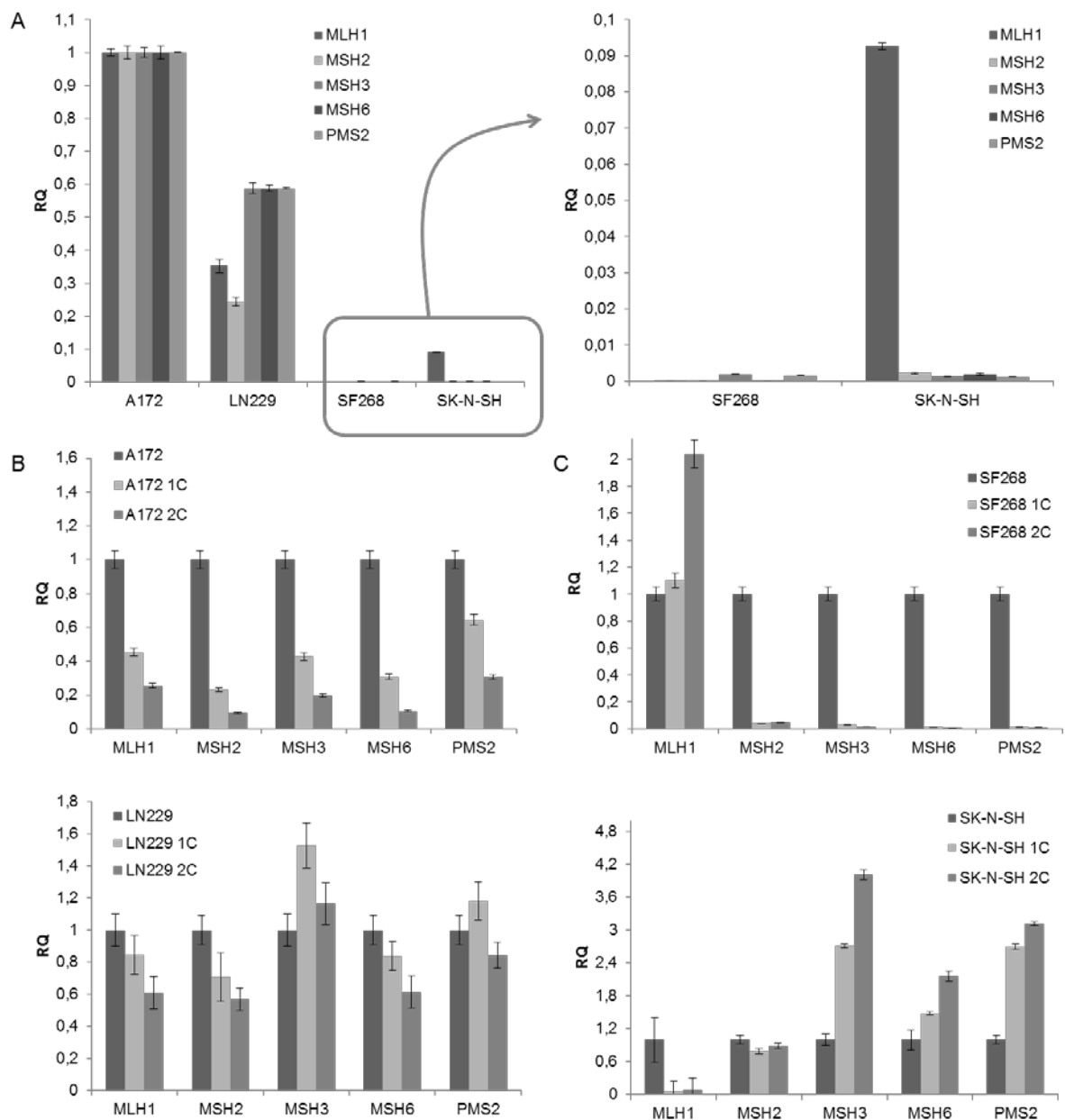


Figura 4.23. Expresión del ARNm, determinada mediante PCR a tiempo real, de los genes del MMR (MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 Y PMS2) de las líneas A172, LN229, SF268 Y SK-N-SH, en su estado basal (A) y tras los ciclos de administración de TMZ (B y C).

En el caso de las líneas sensibles a TMZ, que presentaban una alta expresión de MMR, podemos observar que en el caso de A172, los resultados muestran una clara disminución de

todos los genes analizados tras la administración del primer ciclo de TMZ, que continúa disminuyendo tras la administración del segundo ciclo. La disminución más acusada la encontramos en el gen MSH2, que disminuye un 80% y 90% respecto de los niveles basales en cada uno de los ciclos respectivamente. En la línea LN229, la disminución en MMR es menos acusada que en la línea A172, aunque tiene una tendencia clara a reducir su expresión tras los ciclos de TMZ, fundamentalmente en MSH2 y MSH6 con una disminución de 90% respecto al nivel basal tras el segundo ciclo de TMZ (figura 4.23-B).

En el caso de las líneas con baja expresión basal de MMR, en la línea SK-N-SH, los resultados muestran un incremento progresivo de los genes MSH3, MSH6 y PMS2, llegando a tener una expresión de 4, 2 y 3 veces mayor, respectivamente, tras la administración del segundo ciclo de TMZ, en relación al nivel basal. Sin embargo, la expresión se mantiene estable para el gen MSH2 y disminuye en el caso de MLH1. Para la línea SF268 los resultados muestran una disminución drástica del ARNm de los genes MSH2, MSH3, MSH6 y PMS2, tras los ciclos con TMZ, mientras que la expresión del gen MSH1 se duplica tras el segundo ciclo con TMZ (figura 4.23-C).

4.2. Inhibición de MMR con cloruro de cadmio en las líneas celulares basales

Una vez estudiada la expresión basal y tras los ciclos de TMZ de los genes MMR, se realizó un estudio con cloruro de cadmio, que actúa como inhibidor del sistema MMR. En primer lugar, realizamos un estudio de toxicidad del cloruro de cadmio en las diferentes líneas celulares, seleccionando dos concentraciones, una concentración baja de 2 μM y una concentración alta de 12,5 μM . Tras un tratamiento con ambas dosis a 9 horas y a 3 días, se llevó a cabo la obtención de RNA total de las muestras y el posterior análisis de los genes del MMR.

Los resultados muestran una ligera disminución del gen MSH2 (20%), fundamental en la actividad de MMR, en la línea A172, tratada con una concentración de cloruro de cadmio de 2 μM durante 9 horas, sin embargo, un tratamiento más prolongado (3 días) incrementó de nuevo los niveles de MSH2, aproximándose de nuevo a los valores basales. Este comportamiento fue similar en todos los genes MMR analizados en esta línea, al incrementar la concentración de cloruro de cadmio, encontrando una disminución del 20, 30, 10, 10 y 20% en los genes MLH1, MSH3, MSH6 y PMS2 a las 9 horas de tratamiento, e incrementado en 5, 10, 5, 10 y 15% respectivamente tras 3 días de tratamiento con cloruro de cadmio (figura 4.24). Cuando se trata con una concentración de 12,5 μM durante 9 horas, también se obtiene una bajada de un 25% en la expresión del gen MSH2, bajando un 10% más después de 3 días de tratamiento. El resto de genes del complejo analizados, tienen comportamientos distintos, viéndose una disminución de la expresión del 20, 10 y 10% en los genes MSH2, MSH3 Y MSH6, un incremento en un 10% en PMS2 mientras que MLH1 se mantiene constante. Tras 3 días de tratamiento los genes MLH1, MLH2 y PMS2, disminuyen su expresión en un 5, 10 y 20%, el gen MSH3 se mantiene constante y el gen MSH6 se incrementa un 25%. Para la línea LN229 (figura 4.25) los resultados obtenidos para la concentración 2 μM a las 9 horas son bastante parecidos a los obtenidos a los 3 días, viendo que los genes MLH1, MSH3 y MSH6 prácticamente no presentan alteraciones en cuanto a su expresión, el gen MSH2 tiene una disminución progresiva de un 5% y el gen PMS2 tiene una disminución del 20% a las 9 horas y un incremento del 15% a los 3 días. Para el caso de esta misma línea con una concentración de 12,5 μM se obtiene que los genes que anteriormente no sufrían variaciones, el MSH1, MSH3 y MSH6 ahora presentan una leve disminución de un 5%, la disminución en MSH2 es más acusada pasando a ser de un 15% tras las 9 horas y un 10% más tras los 3 días al igual que en el caso del gen PMS2 que sufre una disminución del 5% tras las 9 horas y un 15% más tras los 3 días.

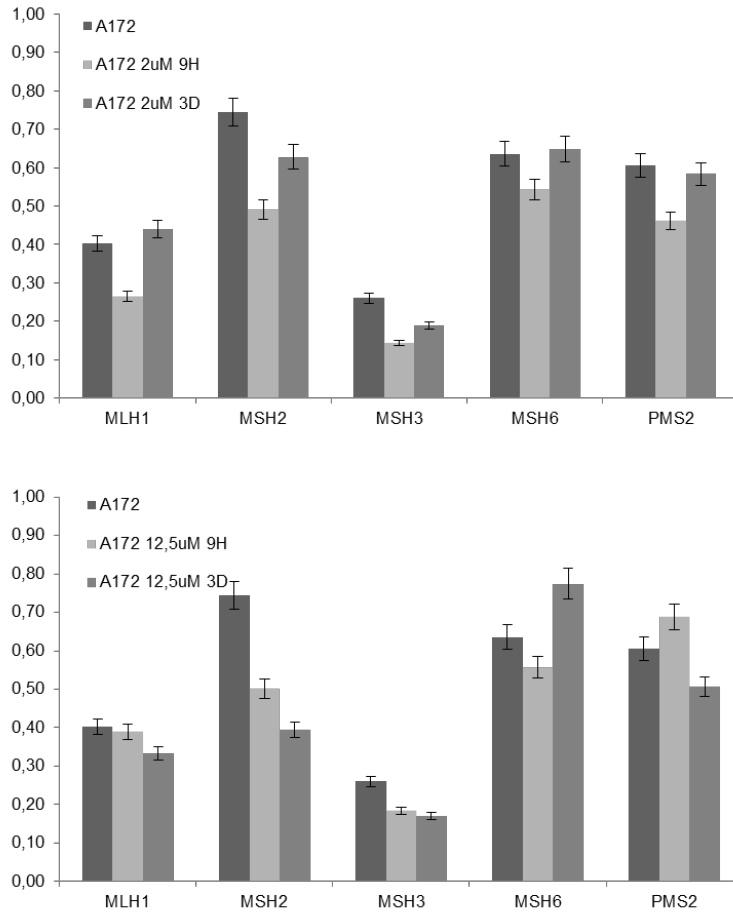


Figura 4.24. Modificación de la expresión del ARNm, determinada mediante PCR a tiempo real, de los genes de estudio del MMR por la adición de cloruro de cadmio 2 μM y 12,5 μM durante 9 horas y 3 días para la línea A172.

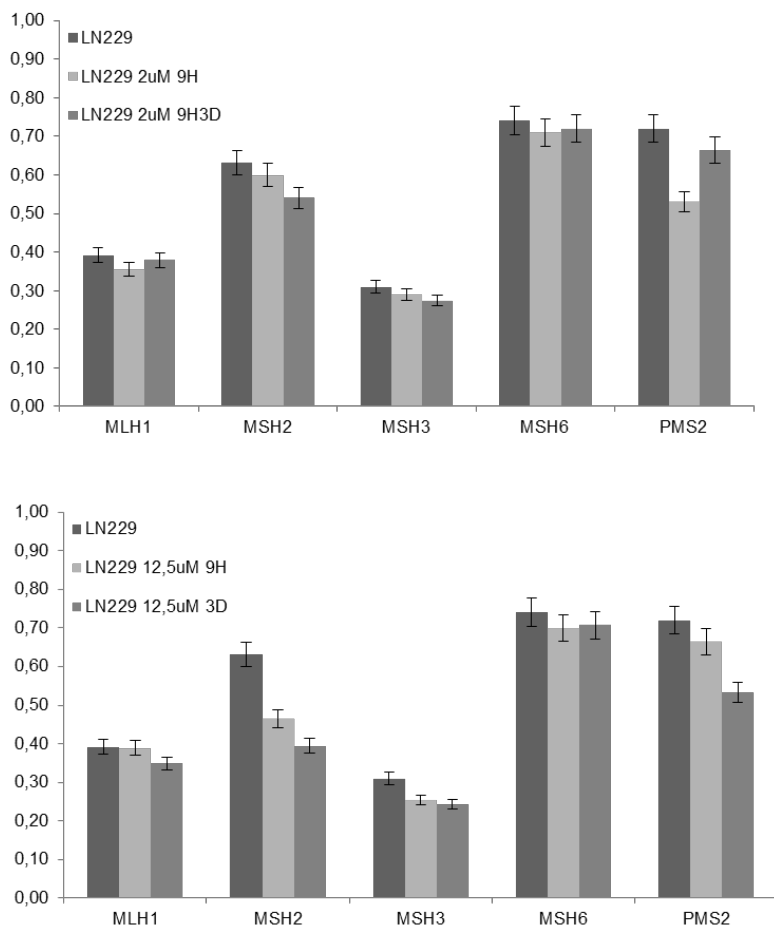


Figura 4.25. Modificación de la expresión del ARNm, determinada mediante PCR a tiempo real, de los genes de estudio del MMR por la adición de cloruro de cadmio 2 μM y 12,5 μM durante 9 horas y 3 días para la línea LN229.

4.2.1. Determinación de la IC_{50} tras la inhibición de MMR con cloruro de cadmio

El estudio de citotoxicidad frente a TMZ, muestra que la inhibición de MMR en las líneas A172 y LN229, que son líneas de alta expresión basal de MMR, tanto con una dosis de 2 μM como con una dosis de 12,5 μM de cloruro de cadmio a 3 días, no modifica significativamente los valores de IC_{50} de las líneas analizadas (figura 4.26)

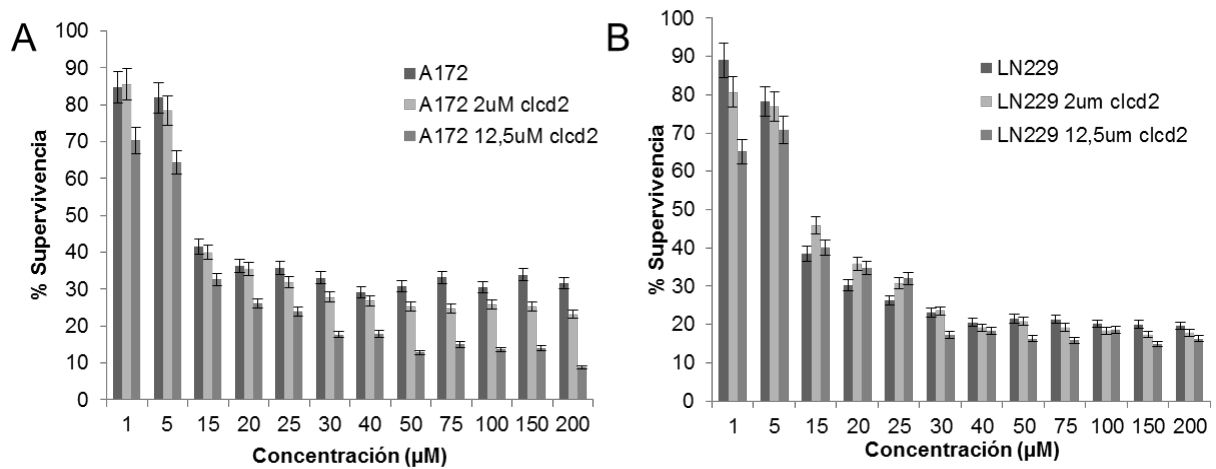


Figura 4.26. Análisis de la IC₅₀ para TMZ de las líneas A172 y LN229 tras el pretratamiento con cloruro de cadmio 2 μM durante 3 días. Los valores representan la media ± S.D. de tres estudios independientes.

5. Análisis de P-glicoproteína

5.1. Análisis de la expresión basal P-glicoproteína en las líneas celulares y tras la exposición a TMZ

El estudio de la expresión de P-glicoproteína, clásico mecanismo de resistencia de las células tumorales frente a los fármacos antineoplásicos, se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real, para ello, tras la extracción de RNA total se realizó una PCR a tiempo real con los primers ABCB1, descritos en el apartado de material y métodos. Para tener una referencia de expresión de P-glicoproteína, se utilizó como control positivo de expresión la línea H15, de cáncer de colon, que bibliográficamente está descrita como una línea que presenta resistencia mediada por p-glicoproteína. Cuando se comparan los resultados obtenidos en las líneas de estudio con los obtenidos para p-glicoproteína, se ve claramente como nuestras líneas carecen

de expresión o tienen unos niveles prácticamente imperceptibles (SF268) de ARNm para la proteína de estudio, en condiciones basales (figura 4.27-A).

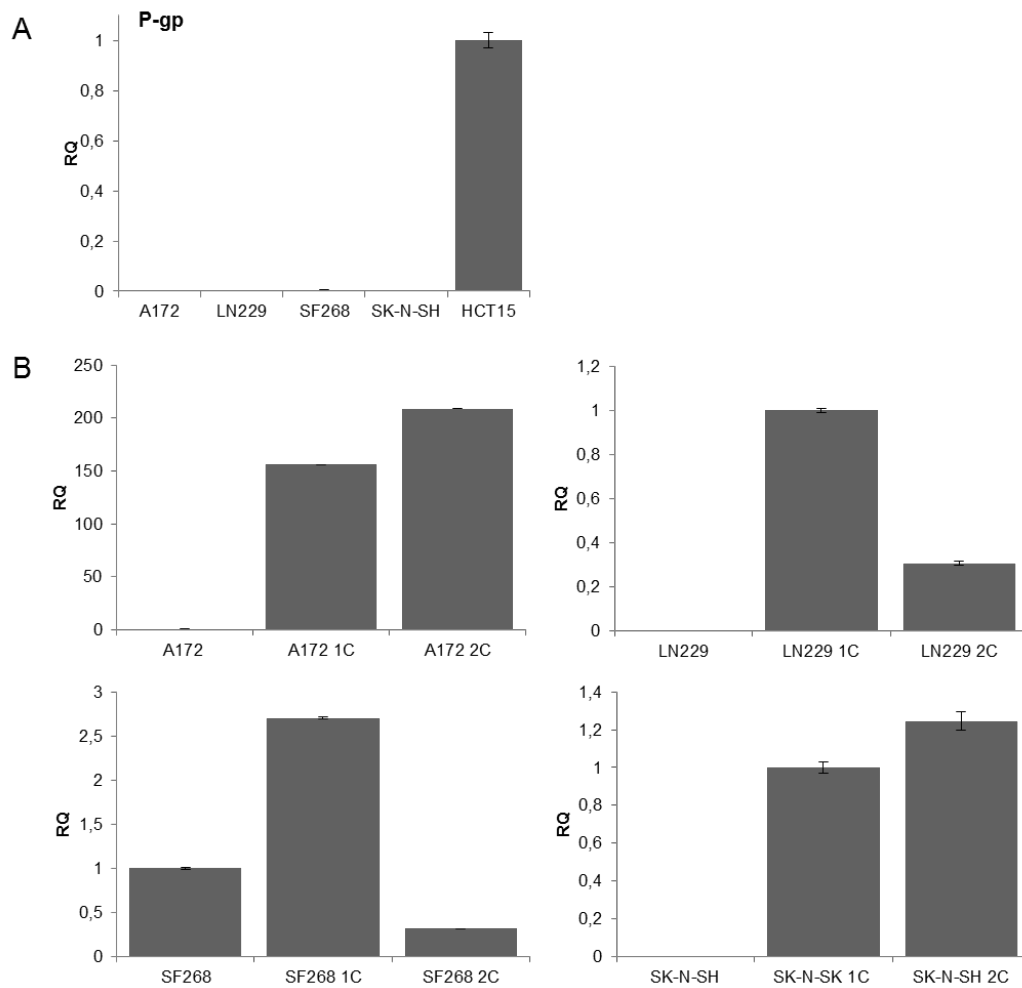


Figura 4.27. Expresión del ARNm de p-glycoproteína de las líneas A172, LN229, SF268 y SK-N-SH, comparadas con HCT15, una línea de cáncer de colon control con resistencia mediada por p-glycoproteína (A). Análisis de la variación de la expresión de ARNm de p-glicoproteína después de la administración de 2 ciclos con TMZ.

Si se analiza cada línea por separado y se compara con el análisis de las muestras obtenidas tras los ciclos con TMZ, los resultados muestran que tras el primer ciclo de TMZ todas las líneas incrementan los niveles de ARNm de P-glicoproteína. En el caso de las líneas

A172 y SF268, el incremento es de 150 y 2,5 veces respectivamente, mientras que en LN229 y SK-N-SH el incremento fue de un 100% en ambas líneas. En el segundo ciclo la expresión de ARNm sigue aumentando en las líneas A172 y SK-N-SH en un 50% y un 20% respecto al primer ciclo, pero disminuye en las líneas LN229 y SF268, siendo un descenso más acusado en esta última (con valores del 75% menor que en la situación basal) (figura 4.27-B)

5.2. Determinación de la IC₅₀ tras la administración de verapamilo

Para comprobar si p-glicoproteína es responsable de la resistencia a TMZ en las líneas celulares de glioblastoma, se realizó un ensayo en el cual se trataron las líneas de estudio con verapamilo, inhibidor de p-glicoproteína, que actúa bloqueando esta proteína de membrana e impidiendo la expulsión del agente antineoplásico del citoplasma celular. En este estudio se utilizó una concentración de 7 mg/ml (14,25 μ M) durante 24 horas antes de la administración de la TMZ. Los resultados obtenidos para cada línea indican que la IC₅₀ de las líneas A172 y LN229, líneas sin expresión de MGMT y con una alta expresión de MMR no se ve modificada tras la adición de verapamilo al medio (figura 4.28-A), mientras que la IC₅₀ de las líneas SF268 y SK-N-SH, líneas con alta expresión de MGMT y baja expresión de MMR se ve aumentada en un 50% pasando de 150 μ M a 250 μ M en SF268 y de 250 μ M a 350 μ M en SK-N-SH (figura 4.28-B).

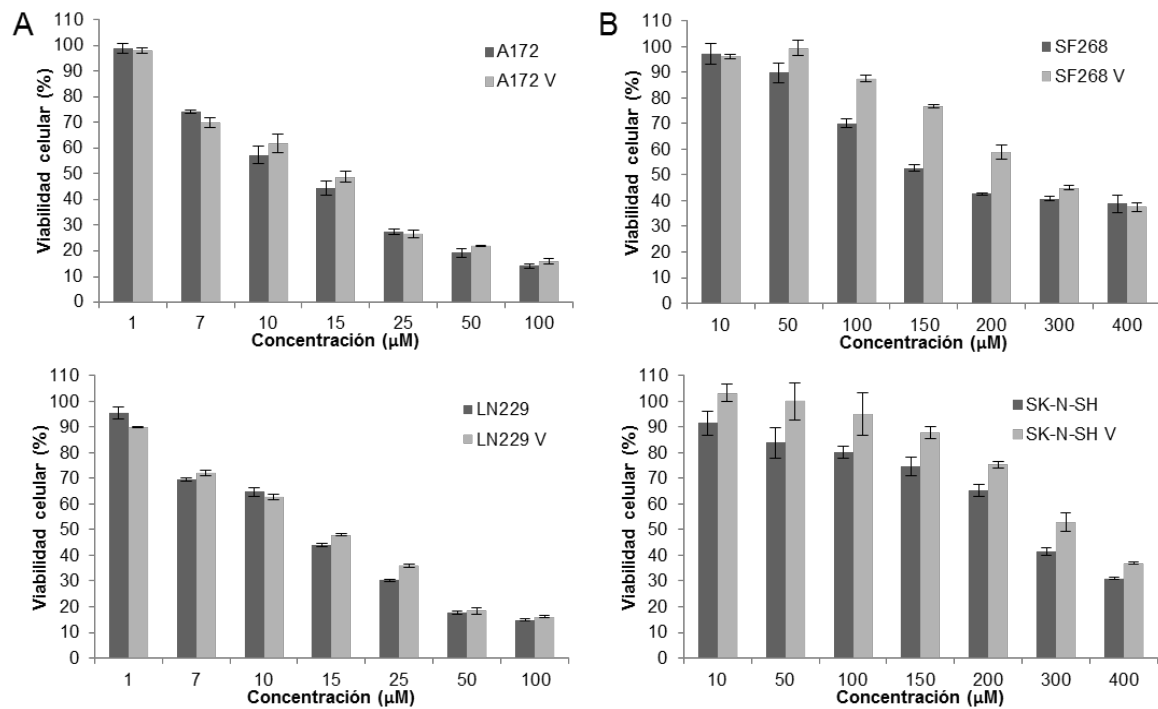


Figura 4.28. Determinación de la IC50 frente a la TMZ para las líneas A172, LN229, SF268 y SK-N-SH tras la adición al medio de verapamilo (V) en una concentración de 7 mg/ml. Los valores representan la media \pm S.D. de tres estudios independientes.

6. Análisis de CD133

Un marcador cuya variación se planteó estudiar en las líneas sometidas al tratamiento con TMZ, fue el CD133. El gen CD133 está considerado marcador de células madre tumorales (CSC), células que son responsables del fracaso tanto a quimio como radioterapia. Por tanto se procedió a estudiar su expresión en los distintos puntos del tratamiento con TMZ.

6.1. Variación de expresión de CD133 tras los sucesivos tratamientos con TMZ

Respecto a la expresión del ARNm del gen CD133, en los resultados obtenidos por RTPCR, podemos observar como a nivel basal y previo al tratamiento con TMZ, utilizando como

referencia la expresión basal de A549 (línea de cáncer de pulmón en la cual se ha descrito bibliográficamente una expresión de CD133), la expresión de CD133 en todas nuestras líneas es menor, siendo la que mayor expresión presenta A172, con una expresión aproximada del 60% respecto a la línea de cáncer de pulmón A549, seguida de LN229 y SK-N-SH, con niveles aproximados de expresión del 40 y 30% respectivamente. Por el contrario, la línea SF268 presenta una expresión apenas detectable de CD133 comparada con A549 (figura 4.29-A).

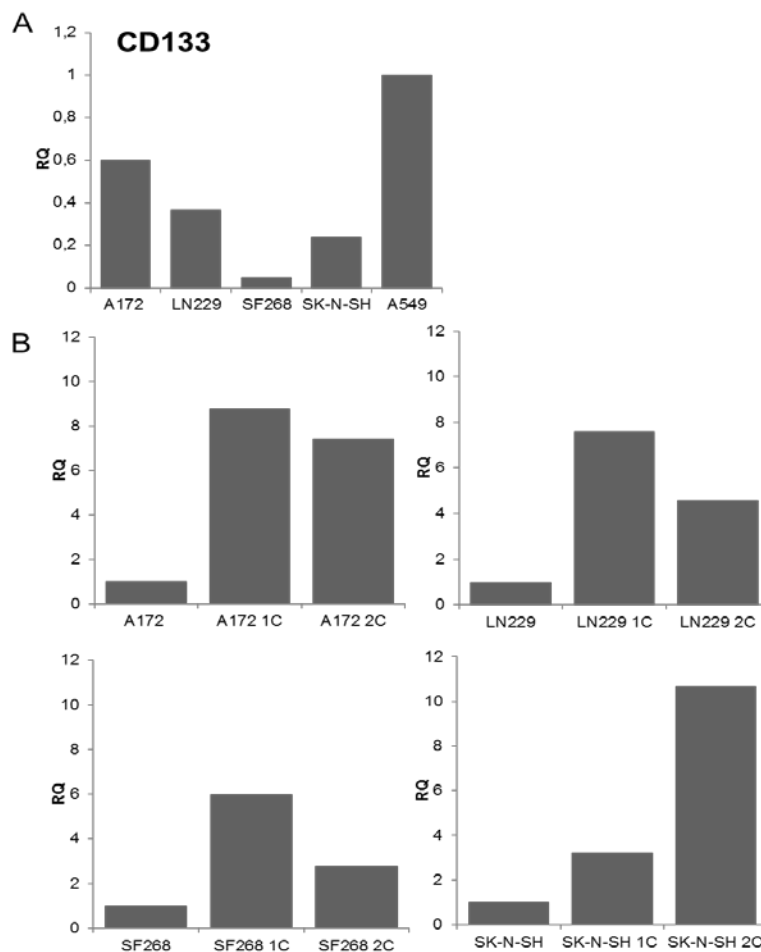


Figura 4.29. Análisis de la expresión, mediante PCR a tiempo real, del gen CD133 en las líneas basales A172, LN229, SF268 Y SK-N-SH (A); Expresión del gen CD133 tras los diferentes ciclos de temozolamida en todas las líneas de estudio (B).

Tras la exposición a los ciclos de TMZ se analizó los niveles de ARNm del gen CD133 en cada línea de estudio (figura 4.29-B), obteniéndose un aumento inicial de la expresión de CD133 de hasta 8 veces en las líneas A172 y LN229, de 6 veces en el caso de la línea SF268 y en último lugar la línea SK-N-SH con un aumento de 3 veces de expresión tras el primer ciclo de TMZ. En el caso de las líneas A172, LN229 y SF 268 tras el segundo ciclo se produce una disminución de la expresión, siendo leve en la línea A172 y siendo más acusada en la línea LN229. En el caso de la línea SK-N-SH tras el segundo ciclo con TMZ se produce un aumento exponencial de los niveles de ARNm, llegando a alcanzar valores de 11 veces la expresión basal de la línea.

Discusión

V. DISCUSIÓN

El glioblastoma multiforme (GBM) es uno de los tumores de Sistema Nervioso que peor pronóstico presenta, siendo actualmente el glioma más agresivo en la población adulta. El objetivo de las investigaciones en este campo, en los últimos años, ha sido mejorar la media de supervivencia y la calidad de vida de estos pacientes, aunque los resultados obtenidos no han permitido modificar sustancialmente la evolución de estos pacientes.

Inicialmente estas investigaciones se han centrado en la mejora de la resección quirúrgica de estos tumores para lo que se ha sido fundamental el avance en el diagnóstico por imagen que ha permitido definir mejor los límites del tumor, y por tanto incrementar la eficiencia de las resecciones quirúrgicas. Sin embargo, la localización de los tumores en la inmensa mayoría de los pacientes, impide la resección completa, siendo bastante frecuente el fenómeno de recidiva tumoral, que provoca un fracaso del tratamiento y una corta tasa de supervivencia (Brandes y cols., 2008). Por ello, ha sido necesario avanzar en los tratamientos de radioterapia y/o quimioterapia de estos pacientes

En los últimos años, las investigaciones en este campo se han focalizado en el tratamiento farmacológico de este tipo de tumor, desarrollándose ensayos clínicos con el agente alquilante TMZ (Mirimano y cols., 2003; Stupp y cols., 2009) en los que se demostró que una combinación de radioterapia con TMZ como coadyuvante, incrementaba significativamente la supervivencia de los pacientes. En el primer caso, Mirimano y cols., (2003) observó que la terapia combinada (radioterapia/quimioterapia) aumentaba la media de la supervivencia de 15 a 21 meses y la probabilidad de supervivencia tras 2 años del 20% en el caso de radioterapia convencional, a un 43% en el caso de radioterapia combinada con TMZ. En el ensayo clínico realizado por Stupp y cols., (2009), se llevó a cabo un seguimiento durante 5 años de los pacientes tras la administración del tratamiento. En este ensayo se observó una

mejora significativa en todos los casos, pasando de 10.9% de supervivencia a los 2 años a un 27% en aquellos pacientes que fueron tratados con radioterapia y TMZ, de un 4,4% a un 16% a los 3 años, de un 3% a un 13,1% a los 4 años y finalmente a los 5 años la supervivencia de aquellos pacientes tratados con TMZ llegó a un 9,8% frente a un 1,9% en aquellos que fueron tratados solamente con radioterapia convencional.

A pesar de que la terapia combinada mejora la esperanza de vida, existen estudios que ponen de manifiesto que determinados pacientes no responden a la terapia con TMZ (Hegi y cols., 2004). Hegi y cols., (2004) observó que en aquellos pacientes que no presentaban silenciamiento del gen MGMT la supervivencia global era inferior a los 18 meses tras la cirugía, (un 92% frente al 38% de aquellos pacientes que presentaban un silenciamiento epigenético del MGMT), considerándolo como un factor pronóstico independiente de respuesta al tratamiento de estos pacientes.

Estos primeros estudios indican la posibilidad de la utilización del nivel de expresión del gen MGMT como factor pronóstico de respuesta al tratamiento con TMZ de los pacientes con glioblastoma, pudiéndose seleccionar aquellos pacientes que tuvieran más probabilidades de beneficiarse de la quimioterapia con fármacos alquilantes, evitando así a los pacientes someterse a un tratamiento con una baja probabilidad de éxito y con una gran número de efectos secundarios adversos. MGMT es una proteína reparadora, que transfiere el grupo alquilo del átomo O⁶ de la guanina del ADN introducido por los agentes alquilantes, como la TMZ, permitiendo la supervivencia celular y por tanto la progresión de la célula tumoral. La expresión de MGMT está controlada epigenéticamente por la metilación de las islas CpG de su promotor (Esteller y cols., 1999; 2000). Existen numerosos estudios in vivo, que vinculan la expresión de MGMT con la respuesta al tratamiento con TMZ siendo más efectivo en aquellos casos en que el promotor del gen *MGMT* se encuentra metilado, provocando un silenciamiento de la expresión de la proteína. El estudio de Spiegl-Kreinecker y cols., (2010),

demuestra un incremento en la supervivencia de 20 meses en aquellos pacientes que no expresan MGMT frente a aquellos en los que si se expresa, cuando los dos grupos de pacientes se someten a un tratamiento con TMZ. Sin embargo, a pesar de que estos estudios demuestran una mejor evolución en pacientes que presentaban silenciamiento epigenético del MGMT, existen otros trabajos en los que se pone de manifiesto que esta correlación no se cumple en todos los casos, como en el estudio de Hegi y cols., (2008) donde no todos los pacientes con glioblastoma que presentaban metilado el promotor de MGMT respondían al tratamiento. Los resultados contradictorios obtenidos podrían indicar que el estado de metilación de MGMT puede no ser el único mecanismo de reparación del ADN involucrado en la respuesta al tratamiento con agentes alquilantes en los pacientes con glioblastoma. Zhang y cols., (2012) analizan otros mecanismos implicados en la reparación del DNA, como el sistema MMR, o sistemas clásicos de proteínas transportadoras de resistencia a drogas, como P-Glicoproteína.

El objetivo de la presente tesis doctoral es en primer lugar, analizar el estado de metilación de 52 pacientes con glioblastoma multiforme y correlacionarlo con la supervivencia de los mismos y en segundo lugar, analizar en modelos in la implicación de diferentes mecanismos de resistencia en la respuesta al tratamiento con TMZ en los tumores de Sistema Nervioso, permitiéndonos avanzar en el conocimiento de los posibles factores pronósticos que nos indiquen las características de los pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con agentes alquilantes.

Correlación entre supervivencia y metilación del gen MGMT

Existen numerosos estudios que correlacionan la metilación del promotor de MGMT con una mayor supervivencia tras el tratamiento, llegando a considerarse factor pronóstico en gliomas malignos. Hegi y cols., (2005) realizaron un estudio en 206 pacientes con glioblastoma

multiforme en el que encontraron un 45% de pacientes con metilación de MGMT cuya media de supervivencia fue 18,2 meses frente a 12,2 meses de aquellos que no poseían dicha metilación, demostrando que el estado de metilación de MGMT era factor predictivo de respuesta al tratamiento en aquellos pacientes sometidos a radioterapia y quimioterapia con TMZ. En los estudios de Brandes y cols., (2008) con una muestra de 103 pacientes determinaron que aquellos pacientes que presentaban metilación en el promotor de MGMT presentaban una media de supervivencia de 46 meses frente a los 17 meses que presentaban aquellos pacientes sin metilación en el promotor de MGMT, y que la metilación, en los pacientes sometidos a radioterapia y TMZ seguido de administración adyuvante de TMZ, era un factor pronóstico independiente para la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en estos pacientes. Weller y cols., en 2009, analizaron 189 pacientes tratados con radioterapia y temozolamida en los que la metilación de MGMT también fue un factor pronóstico significativo mejorando la supervivencia de los pacientes de 6,8 meses a 12,5.

En todos estos estudios la metilación de MGMT resultó ser un factor pronóstico de respuesta al tratamiento con TMZ en pacientes con glioblastoma. Sin embargo, otros autores como Rivera y cols., (2010) al analizar una serie de 225 pacientes concluyó que también en aquellos pacientes que habían recibido únicamente tratamiento radioterápico la metilación del promotor de MGMT era factor pronóstico de supervivencia.

En nuestro estudio de 52 pacientes el estado de metilación de MGMT resultó ser también un factor pronóstico de supervivencia global, 20 meses en metilados frente a 15 meses en no metilados ($p=0,039$). El porcentaje de metilación fue de 53,8% frente al 44,2% que no estaba metilado. Se obtuvo una correlación significativa entre supervivencia y edad de los pacientes, teniendo una mayor supervivencia los pacientes menores o iguales de 50 años frente a los mayores de 50 años ($p=0,005$), tal y como está ampliamente recogido en otros estudios.

Implicaciones de MGMT en el tratamiento con TMZ

En nuestro trabajo de investigación disponemos de líneas celulares de tumores de sistema nervioso que expresan MGMT de forma basal, las líneas SF268 y SK-N-SH, y de líneas que carecen de expresión a nivel basal, tanto a nivel de ARNm como de proteína, las líneas A172 y LN229. Al analizar las IC_{50} de la TMZ para estas líneas tras un tratamiento inicial, observamos que aquellas que presentan altos niveles de expresión de MGMT presentan una mayor resistencia al tratamiento con TMZ, con elevadas IC_{50} que alcanzan los 150 μ M y 250 μ M en las líneas SF268 y SK-N-SH respectivamente. En las líneas que carecen de expresión basal de MGMT la IC_{50} fue de 15 μ M, resultados que coinciden con los de Yoshino y cols., (2010) en el que líneas celulares con baja expresión de MGMT como A172, U-87MG o U-251MG, presentan una IC_{50} inferior a 100 μ M mientras que líneas con alta expresión de MGMT como son T98G o U-138MG presentan una IC_{50} frente a la TMZ mayor a 350 μ M. Nuestros resultados son similares a los Gaspar y cols., (2009) que analizaron la expresión de MGMT y la respuesta a la exposición de TMZ en diferentes líneas celulares, demostrando que aquellas líneas celulares con alta expresión de MGMT son más resistentes al tratamiento con TMZ.

Puesto que el tratamiento quimioterápico de los pacientes con glioblastoma se basa en la administración de ciclos de TMZ, que en determinadas ocasiones conlleva la generación de resistencia al fármaco, sometimos a las diferentes líneas celulares a 2 ciclos con TMZ. Los resultados obtenidos demuestran que en aquellas líneas que expresaban MGMT no se producen modificaciones en la resistencia a TMZ tras los diferentes ciclos administrados, manteniéndose la IC_{50} para la TMZ en una concentración de 150 μ M en SF268 y 250 μ M en SK-N-SH. En cambio, en aquellas líneas donde MGMT no se expresa, se produce un aumento en la resistencia a la TMZ tras los tratamientos. Aunque este aumento de la resistencia se produce en ambas líneas, es más acentuado en la línea LN229, en la que incrementa de 15 μ M a 400 μ M, siendo progresivo entre la primera y la segunda exposición a la TMZ. Estos datos concuerdan con los experimentos realizados por Happold y cols., (2012) en los que generan

líneas resistentes a la TMZ en las que la IC_{50} para la TMZ incrementa 2 veces en la línea LNT-229 resistente respecto a la basal y dos veces en la línea LN-18 resistente. Estos datos también coinciden con el estudio de Jhaveri y cols., (2011) en el que generan líneas resistentes de A172, LN229 y U251 durante 12 meses tras los cuales realizan un ensayo de formación de colonias, viendo como las líneas resistentes alcanzaban una IC_{50} de 1000 μ M mientras que las líneas no resistentes mostraban una IC_{50} de 10 μ M en el caso de A172 y LN229 y de 35 μ M en el caso de U251.

El estado de metilación del promotor de MGMT (Esteller y cols., 1999; 2000), ha sido propuesto en los últimos años como un posible marcador pronóstico de respuesta al tratamiento con TMZ, tal y como hemos comentado en los estudios llevado a cabo en amplias series de pacientes con glioblastoma multiforme y en nuestro propio estudio. Sin embargo, los diferentes estudios realizados por Metellus y cols., (2009) y Brandes y cols., (2010) en 22 y 44 pacientes que habían sufrido una recaída determinaron que la metilación de MGMT era factor pronóstico en la primera cirugía, pero no en la segunda. En las líneas A172, LN229 observamos que tras la exposición a dos ciclos con TMZ, no se modificó el porcentaje de islas CpG metiladas del promotor de MGMT que se mantuvo en el 100%, en SF268 tampoco se observó modificación con un 50-75%. En cambio, en SK-N-SH, hay una pérdida gradual de la metilación, pasando de un 75-100% a un 25-50% en el primer ciclo y a un 0-25% tras el segundo. En relación a la correlación entre el estado de metilación y los niveles de ARNm de MGMT, encontramos una modificación de la expresión de ARNm tras los sucesivos ciclos con TMZ en las que hay variaciones de comportamiento según se trate de líneas con alta o baja expresión de MGMT. En aquellas con expresión de MGMT (SF268 y SK-N-SH) se observa una disminución de la expresión del ARNm de MGMT tras los ciclos con TMZ aunque la IC_{50} no se ve modificada, permaneciendo en 150 μ M y 250 μ M respectivamente. En las líneas sin expresión de MGMT, aquellas que sufren una mayor modificación de la IC_{50} , MGMT incrementa su expresión con respecto al estado basal en el que es prácticamente indetectable, aunque no llegan a

obtenerse datos comparables con las líneas basales de SF268 o SK-N-SH. Sin embargo este incremento del ARNm en las líneas A172 y LN229 no se ve acompañado de un incremento visible en la expresión proteica del gen, la cual no es apreciable por western blot.

Existen diversos estudios de correlación entre metilación y expresión de MGMT. De forma general se acepta que una metilación de las islas CpG del promotor del gen implica una inhibición de la transcripción y por lo tanto un silenciamiento del mismo. Sin embargo, autores como Rood y cols., (2004) o Shaw y cols., (2008) muestran como el grado de metilación del promotor puede influir en la expresión proteica del gen observando que el patrón de metilación es variable y que por debajo de un 50% de metilación no se produce silenciamiento del gen. Kudson y cols., en 2001, consideran que 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 PCR específica de metilación pero no sería suficiente para impedir la síntesis de proteína. Ambos casos, tanto una metilación inferior al 100% o una metilación de un único alelo, podrían explicar la coexistencia de metilación y expresión proteica de MGMT. En nuestro caso, en las líneas A172 y LN229 se produce una metilación completa en el estado basal con tendencia a perderse tras los ciclos en la línea LN299. En el caso de la línea SF268 y SK-N-SH, la pérdida de la metilación es más acentuada provocando una disminución de expresión proteica de MGMT. Para obtener una visión más amplia de cómo afecta la expresión MGMT en las líneas y su relación con la IC_{50} de la TMZ, se utilizaron agentes que nos permitieran modificar la expresión de MGMT haciendo que se exprese o que se silencie. Para aumentar la expresión, utilizamos un agente desmetilante, la 5-Aza-2'-deoxicitidina que al eliminar los grupos metilo de las islas CpG, elimina el silenciamiento epigenético. Waha y cols., (2005) demostraron que la exposición a 5-Aza-2'-deoxicitidina de las líneas U178MG, U87MG, LN428, A172 y U373MG de glioblastoma, durante 3 días, provocaba la desmetilación de los genes *PCDH-γ-A11*, regulados

también por silenciamiento epigenético de su promotor, incrementando su expresión. Guo y cols., (2013), utilizan la 5-Aza-2'-deoxicitidina para desmetilar el promotor de MGMT observando resultados muy positivos en la línea humana de osteosarcoma Saos-2. El tratamiento con 5-Aza-2'-deoxicitidina en nuestras líneas de estudio incrementó la expresión de MGMT lo que no se correlacionó con modificaciones en el valor de la IC₅₀ en aquellas líneas que ya presentaban unos altos niveles de expresión basal de MGMT, indicando que un incremento de la misma no incrementa de forma significativa la resistencia al fármaco. Sin embargo, en aquellas líneas sin expresión basal de MGMT, el incremento de la expresión de esta enzima inducido por 5-Aza-2'-deoxicitidina si provocó un incremento de la IC₅₀ tras el tratamiento con TMZ, pasando de 15 µM a 50 µM en ambas líneas e incrementando por tanto la resistencia al tratamiento.

Por otra parte, y siguiendo con la modificación de la expresión de MGMT, se utilizó O6-benzilguanina (O6BG), que actúa como inhibidor no tóxico de la expresión de MGMT, para silenciarlo en aquellas líneas que la expresan. Las líneas SF268 y SK-N-SH, no presentaban modificaciones significativas de su IC₅₀ tras la inhibición de MGMT con O6BG, a pesar que se conseguía una inhibición de la expresión proteica determinada mediante western blot. Estos resultados difieren de los resultados obtenidos por Zhang y cols., (2010) en los que MGMT juega un papel crucial en la resistencia a la TMZ y en los que al bloquear MGMT en la línea U373V línea con resistencia adquirida a la TMZ se reducía la IC₅₀ de 400 µM a 38,6 µM, haciendo la línea más sensible al tratamiento. Sin embargo, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Von Bueren y cols., (2012) quien al silenciar MGMT en las líneas D341Med y D425Med, procedentes de cultivos primarios no consiguen modificar su resistencia a la TMZ con o sin tratamiento de O6BG. Los estudios de Gaspar y cols., (2010), obtiene resultados similares a los nuestros, con líneas en las que la inhibición de MGMT con O6BG permite disminuir la resistencia a la TMZ como es el caso de la línea SF188 y líneas como la KNS42 en la que no se modifica la resistencia.

Implicaciones del MMR en el tratamiento con TMZ

Uno de los mecanismos que ha aparecido en escena en los últimos años como otro elemento importante en el fenómeno de resistencia a la TMZ y otros agentes alquilantes, es el complejo MMR de reparación del ADN (Happold y cols. 2012; Zhangy cols., 2012). Se ha demostrado en diferentes tipos tumorales que deficiencias en la expresión de los genes que forman parte del complejo, sobre todo de los genes MSH2, MSH6 y PMS2, podrían explicar las variaciones en la IC_{50} frente a la TMZ entre las diferentes líneas tumorales con independencia de la expresión basal de MGMT. Esto se debe a que la disminución en la expresión de alguna de las subunidades de MMR provoca una disminución de la actividad global del complejo MMR implicado en la reparación del DNA ante los ataques de los agentes alquilantes. En nuestro estudio, se ha realizado el análisis de 5 de los genes más importantes del complejo MMR: MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 y PMS2, en las líneas en estado basal y tras la exposición a los dos ciclos de la TMZ. Los resultados muestran que aquellas que poseen mayor expresión de MMR en estado basal son aquellas que carecen de expresión de MGMT y una baja IC_{50} (A172 y LN229) mientras que SF268 y SK-N-SH, líneas con alta expresión de MGMT y una alta IC_{50} a la TMZ, poseen una muy baja expresión de los genes del complejo MMR. Estos estudios concuerdan con los estudios de Gaspar y cols., (2010), en los que se observa una relación entre la expresión de los genes del complejo MMR y la resistencia a la TMZ en líneas como A172, con una alta expresión de MMR pero una baja IC_{50} , o como ocurre en la línea U138MG donde la expresión del gen MSH3 del complejo MMR es muy baja y en cambio se trata de una línea resistente a la TMZ. Cuando tratamos las células con TMZ, hemos observado que en general todas las líneas tienden a una disminución de la expresión de los genes de estudio como respuesta a los ciclos de TMZ. Esta disminución es más acusada en la línea A172 en la que los genes de estudio disminuyen su expresión en más de un 80%. Otros autores como Yip y cols., (2009) han realizado estudios de MMR, especialmente en el gen MSH6, concluyendo en que

una bajada de la expresión de este gen se correlaciona con un aumento en la resistencia frente a la TMZ. En el caso de la línea LN229 la bajada de la expresión no es tan drástica, aunque partimos de una expresión basal de los genes de estudio un 60% inferior frente a la obtenida en A172. Estudios recientes han demostrado que la expresión de MLH1 está relacionada con recurrencia en tumores e incremento de resistencia a TMZ en diferentes líneas de glioblastoma, incluida la LN229 (Shinsato y cols., 2013). En ambas líneas, esta disminución va acompañada de un fuerte incremento en la IC_{50} para la TMZ. En el caso de las líneas SK-N-SH y SF268, la casi inexistente expresión de los genes de estudio del MMR disminuye más aún tras los ciclos de TMZ en genes como MLH1 y MSH2, pero en cambio aumenta en genes como MSH3, MSH6 y PMS2. La proteína MLH1 se une al complejo tras el reconocimiento llevado a cabo por las subunidades MSH2 y MSH6 y su unión junto con la PMS2 permite que el complejo pueda desplazarse por la hélice hasta encontrar una discontinuidad (Stojic y cols., 2004), pero además MSH2 juega un papel importante en la estabilización de MLH1, demostrándose que cuando se inhibe su expresión disminuye la acción de MMR en mayor medida que la inhibición de MLH1 (Shinsato y cols., 2013). Por lo tanto, la sola disminución de esta proteína dará lugar a una disminución considerable de la función reparadora del MMR. En las líneas SF268 y K-N-SH, la IC_{50} durante los ciclos no varía, pudiendo producirse un mecanismo de compensación entre la bajada del MGMT, que hace a la célula más sensible frente a la TMZ, y una disminución de MMR, que hace a la célula más resistente frente a la TMZ, a pesar de la visión clásica de una resistencia a la TMZ mediada por MGMT, lo cual en nuestros resultados es rebatido, ya que el bloqueo de MGMT, prácticamente no afecta a la sensibilidad a la TMZ. Aunque quizá esto pueda ser debido a que en este tipo de líneas celulares la resistencia esté fuertemente mediada por MGMT, no por MMR, si fuera así, se estaría potenciando la acción del complejo MMR al no disponer de suficiente MGMT. Por lo tanto se podría decir que la compensación es debida a que se potencia la resistencia con un mecanismo que la célula no tiene basalmente.

Por otro lado, existen trabajos como el de Maxwell y cols., (2008) en el que no encuentran relación entre una ausencia de MMR y la resistencia a la TMZ en clínica, viendo que pacientes con una alta resistencia a la TMZ tienen ausencia de expresión del gen MSH6 del complejo MMR.

Modificación del ciclo celular por efectos de la TMZ

La TMZ, como la mayoría de agentes quimioterápicos que dañan el DNA induce la detención del ciclo celular (Hirose y cols., 2001). Al estudiar las modificaciones del ciclo celular en las líneas tumorales objeto de estudio, tanto en condiciones basales como tras ser sometidas a contactos previos con TMZ en los diferentes ciclos (1C y 2C), obtenemos diferentes resultados en función de la línea tumoral. Los resultados muestran un comportamiento similar en las líneas A172 y LN229, en el que se puede observar una tendencia a un bloqueo en la fase G2/M reduciéndose la fase S tras el tratamiento con TMZ. En el caso de la línea A172 basal se observa un incremento de un 46% de la fase G2 tras el tratamiento con TMZ. A la hora del análisis de los ciclos de TMZ, vemos que en relación al estado basal sin tratamiento existe un incremento de un 20% de la fase G2. La acumulación en esta fase se mantiene en estas líneas tras los ciclos, pero al recibir de nuevo el tratamiento apenas se incrementa y se mantiene, muy por debajo de la línea basal expuesta por primera vez a TMZ (48,24% en A172 en el primer ciclo de exposición a TMZ frente al 20,04% en A172 en el segundo ciclo de TMZ). En la línea LN229 a pesar de presentar un 20% de bloqueo en G2/M, no existen diferencias en la acumulación de las células en las diferentes fases del ciclo celular entre células basales y tras haber sido sometidas a los diferentes ciclos de TMZ tras administrar el fármaco. Hirose y cols., (2001) al inducir células de la línea U87MG de glioblastoma humana con TMZ a 100 μ M observó que tras 2 días de tratamiento comenzaba a aparecer detención del ciclo celular en fase G2/M, y que esta parada era dependiente de p53

por acumulación de p21. Estas líneas eran MGMT negativas y p-53 wild type, al igual que LN229, en las cuales hemos visto un comportamiento semejante. A-172 expresa una forma de p53 mutada carente de capacidad pro-apoptótica, lo cual podría justificar que las células que ya habían recibido 2 ciclos de TMZ, que presentan una bajada del MMR, no sufriesen tanta parada en G2/M, ya que la apoptosis debería producirse por una vía alternativa p73 (Roos y cols., 2007). En SF268, la cual presenta bastante resistencia para la TMZ, apenas existe acumulación en G2/M ni diferencias entre las células basales y tras los ciclos, lo cual se podría justificar por su p53 mutado y una baja expresión de MMR en las células basales, por lo cual la apoptosis por la vía p73 no podría activarse. En SK-N-SH, existe acumulación en G2/M tras los tratamientos, debido a que presenta una forma de p53 activa, pero tampoco existen diferencias entre las células basales y tras los ciclos con TMZ, lo cual podría deberse a que al igual que en SF268, a los bajos niveles del sistema MMR (responsable de reconocer los emparejamientos erróneos GT y provocar parada del ciclo celular, senescencia y apoptosis en células tratadas con TMZ) (Gunther y cols., 2003).

Implicaciones de la p-glicoproteína en el tratamiento con TMZ

P-glicoproteína (p-gp) se engloba dentro de los transportadores de membrana ABC (ATP-binding cassette superfamilia) y está directamente relacionado con fenómenos de resistencia a multidrogas (MDR) (Sharom y cols., 2008) en varios tipos tumorales, como cáncer de mama (Bao y cols., 2011), cáncer de colon (Weinstein y cols., 1991) o cáncer de pulmón (Berger y cols., 2005). En los últimos años se ha asociado su expresión a una posible resistencia en líneas de tumores de sistema nervioso (Zhang y cols., 2012).

Para realizar el análisis de p-glicoproteína se utilizó como control, una línea de cáncer de colon con resistencia mediada por p-glicoproteína como es HCT15 (Stein y cols., 1996). Los análisis de expresión de ARNm de las líneas de estudio comparadas con la línea control

permitieron observar una expresión muy baja, casi inexistente en algunos casos, algo que es similar a los pocos estudios que se han realizado con líneas de glioblastoma, en los que la línea A172, no expresa p-glicoproteína de forma basal (Nakagawa y cols., 2007). Esto probablemente indica que p-glicoproteína no está implicada en los mecanismos de resistencia en estas líneas. El análisis de la modificación de la expresión de P-glicoproteína tras la exposición de las líneas celulares a los ciclos de TMZ nos permitió observar distintos comportamientos: las líneas A172 y SK-N-SH sufren un incremento en la expresión de ARNm de p-glicoproteína mientras que en las líneas LN229 y SF268 pudimos observar una disminución en los niveles de expresión de esta glicoproteína tras los ciclos de exposición a la TMZ, a pesar de que en cada uno de estos grupos encontramos una línea sensible y otra resistente frente a la TMZ.

Para comprobar si efectivamente p-glicoproteína funcionaba como mecanismo de resistencia se determinó la IC_{50} frente a la TMZ comparando la línea basal normal frente a la línea pretratada con verapamilo (Yusa y cols., 1989). Este pretratamiento, bloquea p-glicoproteína y por lo tanto hace a la célula más sensible al fármaco. Los resultados obtenidos varían en función de si la línea es resistente o no a la TMZ. En el caso de las líneas sensibles, A172 y LN229, tras el estudio de citotoxicidad con un pretratamiento con verapamilo no se observaron diferencias en la IC_{50} . En cambio, en las líneas SF268 y SK-N-SH, líneas resistentes frente a la TMZ, lo que se observó fue un incremento de la IC_{50} tras el pretratamiento con verapamilo. Estos resultados aparentemente contradictorios e inesperados, podrían explicarse debido por un lado a las diferentes rutas de apoptosis realizadas por la célula y por otro lado a que el verapamilo inhibe los transportadores de calcio de la membrana de las células tumorales (Zawadzki y cols., 2008). Para las células con una alta IC_{50} frente a la TMZ, células que expresan altos niveles de MGMT y bajos niveles de MMR, una gran parte de la muerte celular se encuentra mediada por PARP, calpaina y AIF (parptanatos). Estas rutas son dependientes del calcio intramitocondrial (Vosler y cols., 2009) y por lo tanto la adición de verapamilo en el

medio inhibe los transportadores de calcio y las vías de apoptosis. Esto podría explicar un incremento de la IC_{50} tras el bloqueo de p-glicoproteína en estas líneas. En el caso de las líneas A172 y LN229, que presentan un elevado nivel basal de MMR, responsable de la inducción de apoptosis en estas células, el bloqueo de p-glicoproteína con verapamilo no la IC_{50} de la TMZ.

Implicaciones del CD133 en el tratamiento con TMZ

En los últimos años la teoría de que las células madre tumorales son responsables del fracaso quimioterápico, debido a que expresan genes implicados en fenómenos de resistencia, ha cobrado bastante importancia, hasta tal punto que se están aislando en numerosos tumores y se está tratando de llevar a cabo una terapia dirigida frente a esta población celular (Yu y cols., 2012). Este tipo celular es altamente resistentes a la quimioterapia, incluyendo la temozolamida (Liu y cols., 2006), y la radioterapia (Bao y cols., 2006). Uno de los marcadores más utilizados para diferenciar y aislar estas células madre tumorales es el CD133. Este marcador ha permitido el aislamiento de este tipo celular en diferentes tipos de tumores, incluidos los del sistema nervioso (Singh y cols., 2004). Se han llevado a cabo estudios basados en el uso de este marcador como factor pronóstico y los resultados obtenidos son mayormente favorables (Grosse-Gehling y cols., 2013), correlacionándose un mal pronóstico, siendo un indicador de progresión tumoral como en cáncer de colon (Ren y cols., 2013), tumores gástricos (Wen y cols., 2013) o cáncer de páncreas (Xu y cols., 2013). En tumores gliales, los estudios de Zhang y cols., (2008) han demostrado una proporción elevada de células CD133+ (30-60%) en gliomas humanos. Zeppernick y cols., (2008), confirman mediante técnicas inmunohistoquímicas que la fracción CD133 positiva coincide con una zona de recidiva del tumor y un incremento de su agresividad. El estudio de Metellus y cols., (2011) en 44 pacientes con glioblastoma compara la expresión de ARNm de CD133 con la supervivencia de dichos pacientes y el estado de metilación de MGMT. Los resultados obtenidos por este grupo

revelan que los pacientes con mejor pronóstico fueron 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).

Por otra parte, también existen estudios como los de Joo y cols., (2008) en los que no se tiene tan claro que existan diferencias entre células CD133 positivas y negativas. En este estudio se realizan pruebas in vitro de formación de neuroesferas por parte de dos poblaciones, una CD133 positiva y otra negativa no observándose diferencias significativas entre ambas poblaciones. A su vez realizan pruebas in vivo mediante las cuales no observan diferencias en la capacidad de formación tumoral en ratones inmunodeprimidos de células CD133 positivas y negativas. Kim y cols., 2011 tampoco encontraron asociación entre la expresión de diferentes marcadores entre los que se encontraba CD133 y la supervivencia en 88 pacientes con glioblastoma.

Por ello en nuestro estudio se llevó a cabo un análisis de la expresión del marcador CD133 en las líneas basales y tras los sucesivos ciclos de TMZ, para observar las posibles modificaciones de este marcador tras la exposición al fármaco. Los resultados obtenidos indican que en todas las líneas de estudio (A172, LN229, SF268 y SK-N-SH) existe un incremento de la expresión de este marcador, encontrando un incremento de 10 veces en el caso de SK-N-SH. El incremento de la expresión de CD133 lleva asociado una resistencia al fármaco tal y como describen Vangipuram y cols., (2010) en la línea SK-N-SH y Sasaki y cols., (2013) en la línea A172.

Conclusions

VI. CONCLUSIONS

1.- The analysis of the MGMT gene promoter methylation status in paraffin embedded patient samples, can be used as a potential survival predictor in patients diagnosed with glioblastoma multiforme treated with radiotherapy and temozolomide.

2.- The analysis of the MGMT gene promoter methylation status in tumor cell lines of nervous system demonstrated a total methylation approaching in A172 and LN229 lines and a 50% in SF268 and SK-N-SH lines which agree the first case with lines that did not express MGMT and the second lines with a high expression of this enzyme.

3.- Lines with MGMT no expression, A172 and LN229 are sensitive to treatment with temozolomide, showing a 50 inhibitory dose (IC₅₀) of 15 μ M, which increased to 80 μ M in the A172 line and up to 400 μ M in the LN229 line after an exposure of two temozolomide cycles.

4.- The exposure of two temozolomide cycles on the sensitive cell lines A172 and LN229 modify MGMT expression which increased 50-fold and 6-fold in A172 and LN229 respectively.

5.- Lines with MGMT no expression, A172 and LN229, have a high expression level of MMR repair complex, which decreases after exposure of two temozolomide cycles so probably together with an increase of MGMT are responsible of the resistance increase on these lines after temozolamida exposure.

6.- Lines that show high MGMT expression, SF268 and SK-N-SH, are resistant to temozolomide treatment, with an IC₅₀ value of 150 μ M and 250 μ M, respectively, with no changes in the resistance level after exposure of two temozolomide cycles.

7.- Exposure of two temozolomide cycles in resistant lines SF268 and SK-N-SH, modify MGMT expression, which decreases by 60% and 80% respectively.

8.- Lines expressing high levels of MGMT, SF268 and SK-N-SH, have low level expression of MMR repair complex, which decreases after two cycles of temozolomide exposure, this decrease attached to the lower MGMT expression would be responsible for the maintenance of the degree of resistance to temozolomide in these lines.

9.- The classical system of multidrug resistance (MDR) mediated by transporters such as P-glycoprotein appears to not play a fundamental role in the temozolomide resistance in these lines.

10.- Temozolomide administration in all cell lines, increases CD133 marker expression in the resulting cells, suggesting that these cells may be those which have a phenotype of drug resistance and thus responsible for the phenomena of recurrences in patients.

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1.- El análisis del estado de metilación del promotor del gen *MGMT* en muestras de pacientes incluidas en parafina, puede ser usado como posible factor pronóstico de supervivencia en pacientes diagnosticados de glioblastoma multiforme y tratados con radioterapia y temozolamida.

2.- El análisis del estado de metilación del promotor del gen *MGMT* en las líneas celulares tumorales de sistema nervioso demostró una metilación cercana al 100% en las líneas A172 y LN229 y del 50% en las líneas SF268 y SK-N-SH correspondiéndose en el primer caso con líneas que no expresan *MGMT* y en el segundo con líneas que presentan una elevada expresión de esta enzima.

3.- Las líneas que no expresan *MGMT*, A172 y LN229, son sensible al tratamiento con temozolamida, presentando una dosis inhibitoria 50 (IC_{50}) de 15 μ M, que incrementa hasta 80 μ M en la línea A172 y hasta 400 μ M en la línea LN229 tras la exposición a dos ciclos de temozolamida.

4.- La exposición a dos ciclos de temozolamida de las líneas sensibles, A172 y LN229 modifica la expresión de *MGMT*, que incrementa 50 veces en A172 y 6 veces en LN229.

5.- Las líneas que no expresan *MGMT*, A172 y LN229, presentan un elevado nivel de expresión del complejo de reparación MMR, que disminuye tras la exposición a dos ciclos de temozolamida por lo que probablemente junto al incremento de *MGMT* sean los responsables del incremento de la resistencia en estas líneas a la exposición a temozolamida.

6.- Las líneas que presentan una elevada expresión de *MGMT*, SF268 y SK-N-SH, son resistentes al tratamiento con temozolamida, con una IC_{50} de 150 μ M y 250 μ M

respectivamente, no modificándose el nivel de resistencia tras la exposición a dos ciclos de temozolamida.

7.- La exposición a dos ciclos de temozolamida de las líneas resistentes, SF268 y SK-N-SH, modifica la expresión de MGMT, que disminuye un 60% y un 80% respectivamente.

8.- Las líneas que expresan elevados niveles de MGMT, SF268 y SK-N-SH, presentan un bajo nivel de expresión del complejo de reparación MMR, que disminuye tras la exposición a dos ciclos de temozolamida, esta disminución unida a la disminución de la expresión de MGMT serían los responsables del mantenimiento del grado de resistencia a la temozolamida en estas líneas.

9.- El sistema clásico de resistencia a multidrogas (MDR) mediado por transportadores, como p-glicoproteína, parece no desempeñar un papel fundamental en la resistencia a la temozolamida en estas líneas.

10.- La administración de temozolamida en todas las líneas celulares, incrementa la expresión del marcador CD133 en las células resultantes, sugiriendo que pueden ser estas células las que presenten un fenotipo de resistencia a los fármacos y por tanto las responsables de los fenómenos de recidivas en pacientes.

Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Arjona, D., M. J. Bello, et al. (2006). "EGFR intragenic loss and gene amplification in astrocytic gliomas." *Cancer Genet Cytogenet* 164(1): 39-43.
- Baeza, N., M. Weller, et al. (2003). "PTEN methylation and expression in glioblastomas." *Acta Neuropathol* 106(5): 479-85.
- Bao, L., A. Haque, et al. (2011). "Increased expression of P-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model." *Am J Pathol* 178(2): 838-52.
- Baylin, S. B., S. A. Belinsky, et al. (2000). "Aberrant methylation of gene promoters in cancer--- concepts, misconcepts, and promise." *J Natl Cancer Inst* 92(18): 1460-1.
- Berger, W., U. Setinek, et al. (2005). "Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications." *J Cancer Res Clin Oncol* 131(6): 355-63.
- Bestor, T. H. (2000). "The DNA methyltransferases of mammals." *Hum Mol Genet* 9(16): 2395-402.
- Bestor, T. H. and B. Tycko (1996). "Creation of genomic methylation patterns." *Nat Genet* 12(4): 363-7.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." *Genes Dev* 16(1): 6-21.
- Bleehen, N. M. and S. P. Stenning (1991). "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* 64(4): 769-74.
- Blough, M. D., M. C. Zlatescu, et al. (2007). "O6-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells." *Cancer Res* 67(2): 580-4.
- Bordignon, K. C., M. C. Neto, et al. (2006). "Patterns of neuroaxis dissemination of gliomas: suggestion of a classification based on magnetic resonance imaging findings." *Surg Neurol* 65(5): 472-7; discussion 477.
- Brandes, A. A., A. Tosoni, et al. (2008). "Glioblastoma in adults." *Crit Rev Oncol Hematol* 67(2): 139-52.
- Brandes A.A., E. Franceschi, et al. (2010). "O6-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications." *Neuro-Oncology* 12(3):283-288.
- Brandsma D., L. Stalpers, et al. (2008). "Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas." *Lancet Oncol* 9(5):453-61.

- Bronner, C. E., S. M. Baker, et al. (1994). "Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer." *Nature* 368(6468): 258-61.
- Buckner, J. C. (2003). "Factors influencing survival in high-grade gliomas." *Semin Oncol* 30(6 Suppl 19): 10-4.
- Burger, P. C., A. Y. Minn, et al. (2001). "Losses of chromosomal arms 1p and 19q in the diagnosis of oligodendroglioma. A study of paraffin-embedded sections." *Mod Pathol* 14(9): 842-53.
- Buryanov, Y. I. and T. V. Shevchuk (2005). "DNA methyltransferases and structural-functional specificity of eukaryotic DNA modification." *Biochemistry (Mosc)* 70(7): 730-42.
- Cahill, D. P., K. K. Levine, et al. (2007). "Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment." *Clin Cancer Res* 13(7): 2038-45.
- Cardoso, M. C. and H. Leonhardt (1999). "DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development." *J Cell Biol* 147(1): 25-32.
- Carnell, A. N. and J. I. Goodman (2003). "The long (LINEs) and the short (SINEs) of it: altered methylation as a precursor to toxicity." *Toxicol Sci* 75(2): 229-35.
- Casale, F., V. D'Angelo, et al. (2004). "P-glycoprotein 170 expression and function as an adverse independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia." *Oncol Rep* 12(6): 1201-7.
- Castillo M., L. Kwock, et al. (1996). "Clinical application of proton MR spectroscopy." *Am J Neuroradiol* 17:1-15.
- Colot, V. and J. L. Rossignol (1999). "Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device." *Bioessays* 21(5): 402-11.
- Das, P. M. and R. Singal (2004). "DNA methylation and cancer." *J Clin Oncol* 22(22): 4632-42.
- Daumas-Duport, C., B. Scheithauer, et al. (1988). "Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method." *Cancer* 62(10): 2152-65.
- Dolecek, T. A., J. M. Propp, et al. (2012). "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009." *NeuroOncol* 14 Suppl 5: v1-49.
- Esteller, M., J. Garcia-Foncillas, et al. (2000). "Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents." *N Engl J Med* 343(19): 1350-4.
- Esteller M., M. F. Fraga, et al. (2002). "Cancer epigenetics and methylation." *Science* 297:1807-1808.

- Esteller, M., S. R. Hamilton, et al. (1999). "Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia." *Cancer Res* 59(4): 793-7.
- Felsberg, J., N. Thon, et al. (2011). "Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas." *Int J Cancer* 129(3): 659-70.
- Ford, J. M. and W. N. Hait (1990). "Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer." *PharmacolRev* 42(3): 155-99.
- Fraille M., J. L. Carreras, et al. (1994). "Aplicaciones clínicas del SPECT cerebral. En Patología tumoral." Barcelona: Masson S.A. eds.
- Franco-Hernandez, C., V. Martinez-Glez, et al. (2007). "[Biology molecular of glioblastomas]." *Neurocirugia (Astur)* 18(5): 373-82.
- Gaspar, N., L. Marshall, et al. (2010). "MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell gene signature." *Cancer Res* 70(22): 9243-52.
- Goll, M. G. and T. H. Bestor (2005). "Eukaryotic cytosine methyltransferases." *Annu Rev Biochem* 74: 481-514.
- Gorlia, T., M. J. van den Bent, et al. (2008). "Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3." *Lancet Oncol* 9(1): 29-38.
- Grosse-Gehling, P., C. A. Fargeas, et al. (2013). "CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges." *J Pathol* 229(3): 355-78.
- Guo, J., Q. Cui, et al. (2013). "Research on DNA methylation of human osteosarcoma cell MGMT and its relationship with cell resistance to alkylating agents." *Biochem Cell Biol* 91(4): 209-13.
- Gunther W., E. Pawlak, et al. (2003). "Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids." *Br J Cancer* 88: 463-469.
- Happold, C., P. Roth, et al. (2012) "Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells." *J Neurochem* 122(2): 444-55.
- Hardell L., and K. Hansson. (2006). "Mild Mobile phone use and risk of acoustic neuroma: results of the interphone case-control study in 5 North European countries [letter]." *Br J Cancer* 94:1348-1349.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, et al. (2004). "Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide." *Clin Cancer Res* 10(6): 1871-4.

- Hegi, M. E., A. C. Diserens, et al. (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." *N Engl J Med* 352(10): 997-1003.
- Hegi, M. E., L. Liu, et al. (2008). "Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity." *J Clin Oncol* 26(25): 4189-99.
- Herman, J. G., J. R. Graff, et al. (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9821-6.
- Hernán Vélez A., M. William Rojas, et al. (2004). "En: Radiología e imágenes diagnósticas (2ª ed)." Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Hirose Y., M. S. Berger, et al. (2001). "p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells." *Cancer Res.* 61(5):1957-63.
- Ioana, M., C. Angelescu, et al. (2010) "MMR gene expression pattern in sporadic colorectal cancer." *J Gastrointestin Liver Dis* 19(2): 155-9.
- Jacob, S. and F. Praz (2002). "DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis." *Biochimie* 84(1): 27-47.
- Jawahar, A., C. Weilbaecher, et al. (2003). "Multicentric glioblastoma multiforme determined by positron emission tomography: a case report." *Clin Neurol Neurosurg* 106(1): 38-40.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2007). "Cancer statistics, 2007." *CA Cancer J Clin* 57(1): 43-66.
- Jeppesen, D. K., V. A. Bohr, et al. (2011). "DNA repair deficiency in neurodegeneration." *Prog Neurobiol* 94(2): 166-200.
- Jhaveri, N., H. Cho, et al. (2011). "Noscapine inhibits tumor growth in TMZ-resistant gliomas." *Cancer Lett* 312(2): 245-52.
- Joo K.M., S. Y. Kim, et al. (2008). "Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastoma." *Lab Invest* 88:808-815.
- Kikuchi, R., S. M. de Morais, et al. (2013). "In vitro P-glycoprotein efflux ratio can predict the in vivo brain penetration regardless of biopharmaceutics drug disposition classification system class." *Drug Metab Dispos* 41(12): 2012-7.
- Kim K.J., K.H. Lee, et al. (2011). "The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas." *Neuropathology.* 31(5):494-502.
- Klose, R. J. and A. P. Bird (2006). "Genomic DNA methylation: the mark and its mediators." *Trends Biochem Sci* 31(2): 89-97.
- Koukourakis, G. V., V. Kouloulis, et al. (2009). "Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceuticals considerations and efficacy; a review article." *Molecules* 14(4): 1561-77.
- Kundson A.G. (2001). "Two genetics hits (more o less) to cancer." *Nat Rev Cancer* 1:157-162.

- Lacroix, M., D. Abi-Said, et al. (2001). "A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival." *J Neurosurg* 95(2): 190-8.
- Lin, J. H. and M. Yamazaki (2003). "Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications." *Clin Pharmacokinet* 42(1): 59-98.
- Liu, L. and S. L. Gerson (2006). "Targeted modulation of MGMT: clinical implications." *Clin Cancer Res* 12(2): 328-31.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." *Acta Neuropathol* 114(2): 97-109.
- Luczak, M. W. and P. P. Jagodzinski (2006). "The role of DNA methylation in cancer development." *Folia Histochem Cytobiol* 44(3): 143-54.
- Marchesi, F., M. Turriziani, et al. (2007). "Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems." *Pharmacol Res* 56(4): 275-87.
- Maxwell, J. A., S. P. Johnson, et al. (2008). "Mismatch repair deficiency does not mediate clinical resistance to temozolomide in malignant glioma." *Clin Cancer Res* 14(15): 4859-68.
- McDonald, J. M., S. J. See, et al. (2005). "The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors." *Cancer* 104(7): 1468-77.
- Meikle S.R., J.C. Matthews, et al. (1998) "Parametric image reconstruction using spectral analysis of PET projection data." *Phys Med Biol* 43(3):651-66.
- Metellus P., I. Nanni-Metellus, et al. (2011). "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*
- Mirimanoff, R. O., T. Gorlia, et al. (2006). "Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial." *J Clin Oncol* 24(16): 2563-9.
- Nakagawa, T., T. Kubota, et al. (2007). "The combined effects of multiple chemotherapeutic agents for malignant glioma cells." *J Neurooncol* 84(1): 31-7.
- Nakamura M., Y. Yonekawa, et al. (2001). "Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas." *Lab Invest* 81; 77-82.
- Neglia, J. P., L. L. Robison, et al. (2006). "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* 98(21): 1528-37.
- O'Brien, V. and R. Brown (2006). "Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System." *Carcinogenesis* 27(4): 682-92.
- Ohgaki, H. (2005). "Genetic pathways to glioblastomas." *Neuropathology* 25(1): 1-7.

- Papazisis K. T., Geromichalos G. D., et al. (1997) "Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay." *J Immunol Method* 208 (2): 151-8.
- Pegg, A. E., Q. Fang, et al. (2007). "Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase." *DNA Repair (Amst)* 6(8): 1071-8.
- Pilo B., J. Dalmau, et al. (2007). "Actualización del tratamiento de gliomas: Neurología." 22: 159-169.
- Ramirez, C., C. Bowman, et al. (2010). "Loss of 1p, 19q, and 10q heterozygosity prospectively predicts prognosis of oligodendroglial tumors--towards individualized tumor treatment?" *Neuro Oncol* 12(5): 490-9.
- Reik, W., W. Dean, et al. (2001). "Epigenetic reprogramming in mammalian development." *Science* 293(5532): 1089-93.
- Ren, F., W. Q. Sheng, et al. (2013). "CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers." *World J Gastroenterol* 19(17): 2603-11.
- Riley, R. D., W. Sauerbrei, et al. (2009). "Prognostic markers in cancer: the evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond." *Br J Cancer* 100(8): 1219-29.
- Rood B. R., H. Zhang, et al. (2004). "Intercellular heterogeneity of expression of the MGMT DNA repair gene in pediatric medulloblastoma." *Neuro-Oncology* 6:200-207.
- Roos, W. P., L. F. Batista, et al. (2007). "Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine." *Oncogene* 26(2): 186-97.
- Ropolo M., A. Daga, et al. (2009). "Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures." *Mol Cancer Res* 7(3):383-392.
- Salcman M. (1996). "Ernst von Bergmann performs a brain operation by Franz Skarbina." *Neurosurgery*. 38(6):1254-5.
- Saleem, A., G. D. Brown, et al. (2003). "Metabolic activation of temozolomide measured in vivo using positron emission tomography." *Cancer Res* 63(10): 2409-15.
- Sasaki, A., T. Nakajo, et al. (2013). "Gene analysis and dynamics of tumor stem cells in human glioblastoma cells after radiation." *Hum Cell* 26(2): 73-9.
- Selker, R. G., W. R. Shapiro, et al. (2002). "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* 51(2): 343-55; discussion 355-7.
- Sell, S. (2006). "Cancer stem cells and differentiation therapy." *Tumour Biol* 27(2): 59-70.
- Shapiro, R. and J. M. Weisgras (1970). "Bisulfite-catalyzed transamination of cytosine and cytidine." *Biochem Biophys Res Commun* 40(4): 839-43.

- Sharom, F. J. (2008). "ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance." *Pharmacogenomics* 9(1): 105-27.
- Shaw R.J., G. L. Hall, et al. (2008). "The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: correlation of quantitative methylation data with gene expression." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134(3):251-6.
- Shinsato, Y., T. Furukawa, et al. (2013). "Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma." *Oncotarget* 4(12): 2261-70.
- Shrieve, D. C., E. Alexander, 3rd, et al. (1995). "Comparison of stereotactic radiosurgery and brachytherapy in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme." *Neurosurgery* 36(2): 275-82; discussion 282-4.
- Simpson, J. R., J. Horton, et al. (1993). "Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26(2): 239-44.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* 432(7015): 396-401.
- Spiegel-Kreinecker, S., C. Pirker, et al. (2010). "O6-Methylguanine DNA methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients." *Neuro Oncol* 12(1): 28-36.
- Stein, U., W. Walther, et al. (1996). "Modulation of mdr1 expression by cytokines in human colon carcinoma cells: an approach for reversal of multidrug resistance." *Br J Cancer* 74(9): 1384-91.
- Stojic, L., R. Brun, et al. (2004). "Mismatch repair and DNA damage signalling." *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 1091-101.
- Stupp, R. and M. E. Hegi (2007). "Methylguanine methyltransferase testing in glioblastoma: when and how?" *J Clin Oncol* 25(12): 1459-60.
- Stupp, R., M. E. Hegi, et al. (2009). "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* 10(5): 459-66.
- Szyf, M., P. Pakneshan, et al. (2004). "DNA methylation and breast cancer." *Biochem Pharmacol* 68(6): 1187-97.
- Van Meir, E. G., C. G. Hadjipanayis, et al. (2010). "Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma." *CA Cancer J Clin* 60(3): 166-93.
- Vangipuram, S. D., Z. J. Wang, et al. (2010). "Resistance of stem-like cells from neuroblastoma cell lines to commonly used chemotherapeutic agents." *Pediatr Blood Cancer* 54(3): 361-8.

- Villano, J. L., T. E. Seery, et al. (2009). "Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets." *Cancer Chemother Pharmacol* 64(4): 647-55.
- von Bueren, A. O., M. D. Bacolod, et al. (2012). "Mismatch repair deficiency: a temozolomide resistance factor in medulloblastoma cell lines that is uncommon in primary medulloblastoma tumours." *Br J Cancer* 107(8): 1399-408.
- Vosler, P. S., D. Sun, et al. (2009). "Calcium dysregulation induces apoptosis-inducing factor release: cross-talk between PARP-1- and calpain-signaling pathways." *Exp Neurol* 218(2): 213-20.
- Waha, A., S. Guntner, et al. (2005). "Epigenetic silencing of the protocadherin family member PCDH-gamma-A11 in astrocytomas." *Neoplasia* 7(3): 193-9.
- Walker, M. D., E. Alexander, Jr., et al. (1978). "Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial." *J Neurosurg* 49(3): 333-43.
- Watanabe, K., K. Sato, et al. (1997). "Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies." *Clin Cancer Res* 3(4): 523-30.
- Weinstein, R. S., S. M. Jakate, et al. (1991). "Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis." *Cancer Res* 51(10): 2720-6.
- Weller M., J. Felsberg, et al. (2009). "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* 27:5743-5750.
- Weller M., R. Stupp, et al. (2010). "MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?" *Nat Rev Neurol* 6,39-51
- Wen, L., X. Z. Chen, et al. (2013). "Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in gastric cancer: a systematic review." *PLoS One* 8(3): e59154.
- Wessler, J. D., L. T. Grip, et al. (2013). "The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs." *J Am Coll Cardiol* 61(25): 2495-502.
- Westphal, M., D. C. Hilt, et al. (2003). "A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma." *Neuro Oncol* 5(2): 79-88.
- Wong, A. D., M. Ye, et al. (2013). "The blood-brain barrier: an engineering perspective." *Front Neuroeng* 6: 7.
- Wrensch, M., Y. Minn, et al. (2002). "Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature." *Neuro Oncol* 4(4): 278-99.

- Wu, J. C. and D. V. Santi (1987). "Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase." *J Biol Chem* 262(10): 4778-86.
- Xu, L. (2013). "Cancer stem cell in the progression and therapy of pancreatic cancer." *Front Biosci (Landmark Ed)* 18: 795-802.
- Yip, S., J. Miao, et al. (2009). "MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance." *Clin Cancer Res* 15(14): 4622-9.
- Yoder, J. A., C. P. Walsh, et al. (1997). "Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites." *Trends Genet* 13(8): 335-40.
- Yoshino, A., A. Ogino, et al. (2010). "Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas." *Int J Oncol* 36(6): 1367-77.
- Yu, Z., T. G. Pestell, et al. (2012). "Cancer stem cells." *Int J Biochem Cell Biol* 44(12): 2144-51.
- Yung W. K., M. D. Prados, et al. (1999). "Multicenter fase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumour Group." *J Clin Oncol* 17:2762.
- Yusa, K. and T. Tsuruo (1989). "Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells." *Cancer Res* 49(18): 5002-6.
- Zawadzki, A., Q. Liu, et al. (2008). "Verapamil inhibits L-type calcium channel mediated apoptosis in human colon cancer cells." *Dis Colon Rectum* 51(11): 1696-702.
- Zeppernick, F., R. Ahmadi, et al. (2008). "Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients." *Clin Cancer Res* 14(1): 123-9.
- Zhang, J., M. F. Stevens, et al. (2010). "Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications." *Oncology* 78(2): 103-14.
- Zhang, J., M. F. Stevens, et al. (2012). "Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance." *Curr Mol Pharmacol* 5(1): 102-14.
- Zhang M., T. Song, et al. (2008). "Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 27:85-92.

Anexo

RESEARCH Open Access

MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy

Consolación Melguizo^{1,2}, Jose Prados^{1,2*}, Beatriz González³, Raul Ortiz^{1,4}, Angel Concha⁵, Pablo Juan Alvarez¹, Roberto Madeddu^{6,7}, Gloria Perazzoli¹, Jaime Antonio Oliver¹, Rodrigo López⁵, Fernando Rodríguez-Serrano^{1,2} and Antonia Aránega^{1,2}

Abstract

Background: The CD133 antigen is a marker of radio- and chemo-resistant stem cell populations in glioblastoma (GBM). The O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) enzyme is related with temozolomide (TMZ) resistance. Our purpose is to analyze the prognostic significance of the CD133 antigen and promoter methylation and protein expression of MGMT in a homogenous group of GBM patients uniformly treated with radiotherapy and TMZ. The possible connection between these GBM markers was also investigated.

Methods: Seventy-eight patients with GBM treated with radiotherapy combined with concomitant and adjuvant TMZ were analyzed for MGMT and CD133. MGMT gene promoter methylation was determined by methylation-specific polymerase chain reaction after bisulfite treatment. MGMT and CD133 expression was assessed immunohistochemically using an automatic quantification system. Overall and progression-free survival was calculated according to the Kaplan–Meier method.

Results: The MGMT gene promoter was found to be methylated in 34 patients (44.7%) and unmethylated in 42 patients (55.3%). A significant correlation was observed between MGMT promoter methylation and patients' survival. Among the unmethylated tumors, 52.4% showed low expression of MGMT and 47.6% showed high expression. Among methylated tumors, 58.8% showed low expression of MGMT and 41.2% showed high expression. No correlation was found between MGMT promoter methylation and MGMT expression, or MGMT expression and survival. In contrast with recent results, CD133 expression was not a predictive marker in GBM patients. Analyses of possible correlation between CD133 expression and MGMT protein expression or MGMT promoter methylation were negative.

Conclusions: Our results support the hypothesis that MGMT promoter methylation status but not MGMT expression may be a predictive biomarker in the treatment of patients with GBM. In addition, CD133 should not be used for prognostic evaluation of these patients. Future studies will be necessary to determine its clinical utility.

Keywords: Glioblastoma, Radiotherapy, Temozolomide, MGMT, Methylation, CD133

*Correspondence: jcpados@ugr.es

¹Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Granada 18100, Spain

²Department of Anatomy and Embryology, University of Granada, Granada 18012, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Glioblastoma (GBM), the most common primary brain tumor in adults, is a rapidly progressive and fatal disease with a low median overall survival [1]. The treatment of these tumors with temozolomide (TMZ) introduces groups into DNA preventing its replication. This structural modification induces cell death. However, DNA-repair proteins, such as O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase (AGT), are able to remove alkyl adducts from the O⁶ position of guanine. Which is especially harmful, and the O⁴ position of thymine, restoring these DNA bases and preventing TMZ-induced cell death [2]. The DNA-repair protein AGT is encoded by the gene O⁶-Methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT). Determination of promoter methylation of the MGMT gene is being included as a relevant factor of the patient molecular profile [3]. Although epigenetic silencing of the MGMT gene promoter has been associated with prolonged survival in glioblastoma patients [4], there is much controversy about its use as a prognostic marker for the response of patients with newly diagnosed glioblastoma to temozolomide [5,6]. Moreover, whether any correlation exists between MGMT protein expression and promoter hypermethylation and patient outcomes has not been elucidated. Therefore, various studies using different assessments have reported different results [7-11]. These inconsistencies may be caused by intratumoral heterogeneity, different evaluation methods, and different cut-off values.

The cancer stem cell (CSC) theory postulates that tumors arise from a subpopulation of cells that are characterized by self-renewal, infinite proliferative potential, multipotency, and their ability to initiate new tumors *in vivo* [12]. Interestingly, CSC cells are postulated to be mediators of radio- and chemo-resistance. Tumor cells with stem-like features have been identified in glioblastoma [13]. These cells express the transmembrane glycoprotein prominin-1 (CD133) (a cell-surface marker expressed on normal human neuronal stem cells) and have the ability to initiate a tumor *in vivo* after xenotransplantation in mice. Few data are available on the actual prognostic impact of CD133 expression in malignant gliomas. Glioblastoma stem cells are highly resistant to conventional chemotherapy and radiotherapy [14,15] and the chemo-radioresistance of these cells may be responsible for the poor clinical outcome of these patients.

The aim of our study is to determine the prognostic significance of MGMT by analyzing both MGMT gene promoter methylation and protein expression in a homogenous series of GBM patients treated with radiotherapy and temozolomide. In addition, we evaluated the immunohistochemical expression of CD133 investigating its association with MGMT and clinical outcomes.

Methods

Tissue samples

Samples were obtained from the Anatomopathological Service of Hospital Virgen de las Nieves from Granada (Spain) and the University Hospital of Sassari (Italy), from 2001 to 2009. The Ethics Committees of both Hospitals approved the collection and use of human brain tumor tissues samples. We obtained tumor tissue samples from 78 patients with newly diagnosed GBM which was histologically confirmed and Karnofsky performance score (KPS) ≥ 60 . Patients were selected regardless of extent of surgery. All patients had been treated with concurrent chemoradiotherapy (2 Gy per fraction, once a day, five days a week, 60 Gy total dose) with concomitant TMZ (75 mg per square meter of body surface area per day for seven days a week from the first to the last day of radiotherapy) followed by adjuvant TMZ (200 mg per square meter of body surface area on days 1 to 5 given at four-weekly intervals). The patient characteristics are summarized in Table 1.

Patients age 70 years or older with newly diagnosed GBM and postoperative Karnofsky performance score (KPS) greater than 60 were eligible for this non-randomized phase II trial.

DNA extraction, bisulfite treatment and methylation-specific PCR

DNA was extracted according to standard protocols. Methylation patterns in the CpG island of MGMT were determined by chemical modification of unmethylated, but not methylated, cytosine to uracil. Methylation-specific PCR (MSP) was performed with primers specific for either modified-methylated or unmethylated DNA, as described previously [16]. DNA (2 μ g) was denatured with sodium hydroxide and modified with sodium bisulfite. DNA samples were then purified (EpiTect Bisulfite Conversion). Primer sequences for the unmethylated reaction were 5'-TTTGTGTTTGTATGTTTGTAGGTTTTTGT-3' (forward primer) and 5'-AACTCCACTCTTCCAAAAA CAAAACA-3' (reverse primer), and for the methylated reaction, they were 5'-TTTCGACGTTCTAGGTTTTC GC-3' (forward primer) and 5'-GCACTCTTCCGAAAAC GAAACG-3' (reverse primer). Amplified products of PCR were electrophoresed on 3% agarose gels, were visualized by staining with ethidium bromide, and were examined under UV illumination.

Immunohistochemistry

Antibodies for MGMT (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and CD133 (1:50; Abcam, Cambridge, UK) were used for immunohistochemical analysis. Immunostaining was performed using the Bond Polymer Refine Detection system (Leica Microsystems S.L.U., Barcelona, Spain). Briefly, representative paraffin blocks were cut consecutively at a

Table 1 Patient characteristics (n=78)

Age (years)	Mean	56
	Range	
	Male	24-81
	Female	36 (46.1%)
Tumor location	Frontal	20 (25.6%)
	Parietal	13 (16.6%)
	Temporal	13 (16.6%)
	Occipital	11 (14.1%)
	More than one lobe	21 (26.9%)
Duration of symptoms prior to diagnosis	<3 months	60 (76.9%)
	≥3 months	18 (23.1%)
Karnofsky performance score ≥60 (78 (100%))		

thickness of 4 mm, and immunohistochemical staining was carried out using the Microprobe Immuno/DNA stainer (Fisher Scientific, Tustin, CA, USA). Sections were deparaffinized in xylene and treated with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 20 min to block endogenous peroxidase activity. These sections were washed in phosphate-buffered saline and then incubated with primary antibodies for 60 min. The samples were then incubated in secondary antibody for 8 min. The substrate chromogen, 3,3'-diaminobenzidine (DAB), enabled visualization of the complex via a brown precipitate. Hematoxylin (blue) counterstain enabled the visualization of the cell nuclei. Omission of primary antibody served as a negative control. Readings were taken automatically with the ACIS III DAKO system for quantification immunohistochemistry and were verified by two experienced pathologists. The percentage of stained tumor cells was scored as +/- (<10%), 1+ (10% to 25%), 2+ (25% to 50%), 3+ (>50%). For statistical analysis, scores of +/- and 1+ were defined as low-expression group and scores of 2+ and 3+ were defined as high-expression.

Statistical analysis

Overall survival (OS) was calculated from the date of the diagnosis. The progression-free survival (PFS) was calculated from the date of the progression, according to Mac Donald criteria [17]; size and volume ≥25% of initial measurements, or appearance of a new lesion, or if the patient's neurologic condition worsened and required an increased dose of steroids. The PFS and OS curves were estimated by the Kaplan-Meier method and compared using the two-sided log-rank test. A multivariable analysis was done using the Cox proportional hazards regression to determine the prognostic effect of variables. Contingency tables were analyzed by χ^2 and Fisher's exact test. The McNemar test was applied to compare variables before and after treatment. All calculations were made using the statistical software SPSS,

version 15.0. Statistical significance was set at the level of $P < 0.05$.

Results

MGMT promoter methylation status and MGMT protein expression
 The methylation status of the MGMT promoter and MGMT protein expression was determined for 76 of the 78 tumors (97.4%). Two of the 78 GBM cases were excluded due to unsuccessful PCR amplification. MGMT promoter methylation was detected in 44.7% (34/76) of the GBM samples analyzed by MSP (Figure 1). A positivity score of 1+, 2+ and 3+ were detected in 31 (40.8%), 19 (25%) and 15 (19.7%) cases respectively (Figure 2). Only 11 (14.5%) cases showed a score of +/- (Table 2). For the correlation of MGMT promoter methylation with MGMT protein expression, the scores +/- and 1+ were categorized into a low-expression group (42, 55.3%), and scores 2+ and 3+ into a high-expression group (34, 44.7%). Among the 42 unmethylated tumors, 22 (52.4%) showed low-expression of MGMT and 20 (47.6%) showed high-expression while among the 34 methylated tumors, 20 (58.8%) showed low-expression of MGMT and 14 (41.2%) showed high-expression. No correlation between MGMT protein expression and MGMT promoter methylation was observed ($P = 0.903$).

CD133 protein expression

CD133 expression was available for 75 of the 78 patients (96.2%). Among the 75 samples, 26 (34.7%), 27 (36%) and 7 (9.3%) were included as scores 1+, 2+ and 3+ respectively. Fifteen (20%) cases showed a score of +/- (Figure 3). As was done previously, to correlate MGMT and CD133 protein expression, the scores were categorized into a low-expression group (41, 54.7%), and a high-expression group (34, 45.3%) (Table 2). Analysis of a possible correlation between CD133 expression and MGMT protein expression or MGMT promoter methylation was negative.

Influence of MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 protein expression on overall survival
 Statistical analysis showed a significant correlation between OS and MGMT promoter methylation status (Figure 4A). The median OS among patients with methylated MGMT promoter tumors was 19 months (95% CI, 9.6-28.4 months) compared with 13 months (95% CI, 10.5-15.4 months) in patients with unmethylated MGMT promoter tumors (log-rank, $P = 0.031$). In contrast, OS showed no statistically significant differences when it was correlated with MGMT expression (log-rank, $P = 0.894$) (Figure 4B). The median OS among patients with high-expression of MGMT was 12 months (95% CI, 8.8-15.2 months) compared with 13 months

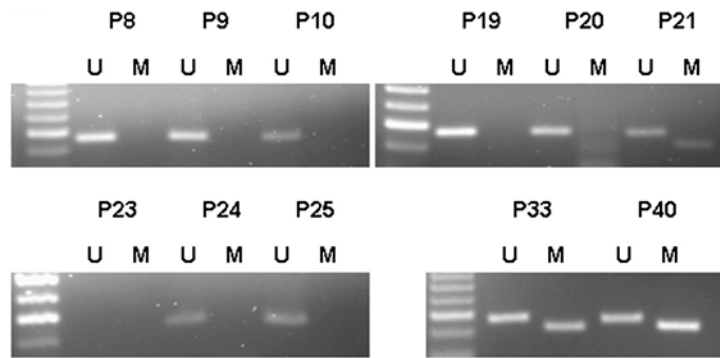


Figure 1 Representative methylation-specific PCR (MSP) analyses of the MGMT promoter in GBM tissue from eleven patients (P). Note the presence of bands in both the un-methylated (U, 93 bp) and methylated (M, 81 bp) lanes for glioblastoma samples 21, 33 and 40, reflecting a methylated MGMT promoter. The lack of a band in the lane corresponding to methylation-specific primers for GBM in the rest of the samples reflects the absence of MGMT promoter methylation. In some samples, such as sample 23, no PCR products were observed (sample excluded).

(95% CI, 8.1–17.9 months) in low-expression of MGMT tumors (log-rank, $P=0.894$). In addition, no differences were observed between survival estimates of patients with CD133 low-expression tumors and CD133 high-expression tumors (Figure 4C). The median OS among patients with CD133 high-expression tumors was 14 months (95% CI, 9.1–18.9 months) compared with 13 months (95% CI, 6.1–19.8 months) in CD133 low-expression tumors (log-rank, $P=0.787$).

Influence of MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 protein expression on progression-free survival
The median PFS was 8 months (95% CI, 4–12 months) for the methylated MGMT promoter status compared with 6 months (95% CI, 2.6–9.4 months) for the unmethylated MGMT promoter status, showing a significant correlation (log-rank, $P=0.036$) (Figure 5A). By contrast, no significant correlation was observed between PFS and MGMT protein expression (Figure 5B). Finally, in these groups, the median PFS was 7 months (95% CI, 5.2–8.8 months) for low-CD133 expression tumors compared with 8 months (95% CI, 6.7–9.3 months) for high-CD133 expression tumors ($P=0.118$) (Figure 5C).

Influence of MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 protein expression on treatment response
All patients were assessed for clinical and radiological response. The statistical analysis showed that only the MGMT promoter status significantly correlated with radiological response ($P=0.036$). The responder rate was significantly higher among patients with a methylated MGMT promoter status versus an unmethylated status (43.3% and 17.5%, respectively) ($P=0.036$) (Table 3).

MGMT promoter methylation and MGMT and CD133 protein expression in recurrent GBM
This study included 11 patients of the 78 patients who underwent reoperation for tumor recurrence after radiochemotherapy. One of the 11 GBM cases was excluded. In spite of the few samples, there were no significant differences between variables before and after treatment with radiotherapy and temozolomide (McNemar test) (Table 4).

Discussion

Clinical trials have demonstrated a significantly prolonged median survival of GBM patients treated with TMZ associated to radiotherapy after surgical resection [18–20]. In addition, a strong correlation between the MGMT gene promoter methylation status and the TMZ treatment effect and outcome was shown by Hegi et al. [4], confirming previous results which correlated MGMT inactivation and clinical response to alkylating agents [16, 21]. Crinieri et al. [22] showed that while the MGMT promoter methylation status had no impact on the OS of GBM patients treated with alkylating agents, it did have an impact on those treated with chemo-radiotherapy, suggesting that the prognostic impact of this methylation is dependent on the therapeutic modalities. In fact, Weller et al. [23] analyzed patients with GBM treated with radiotherapy, with chemotherapy and with both radiotherapy and chemotherapy and showed that the methylation status was a significant prognostic factor for OS and PFS only in the subgroup of patients treated with radiotherapy and concurrent TMZ. These results have been recently confirmed by Cao et al. [8], Minniti et al. [24] and Kim et al. [25]. Recently, the methylation status was analyzed in elderly patients with GBM and was found to be strictly correlated with the pattern of, and time until, GBM recurrence [26], but not with its

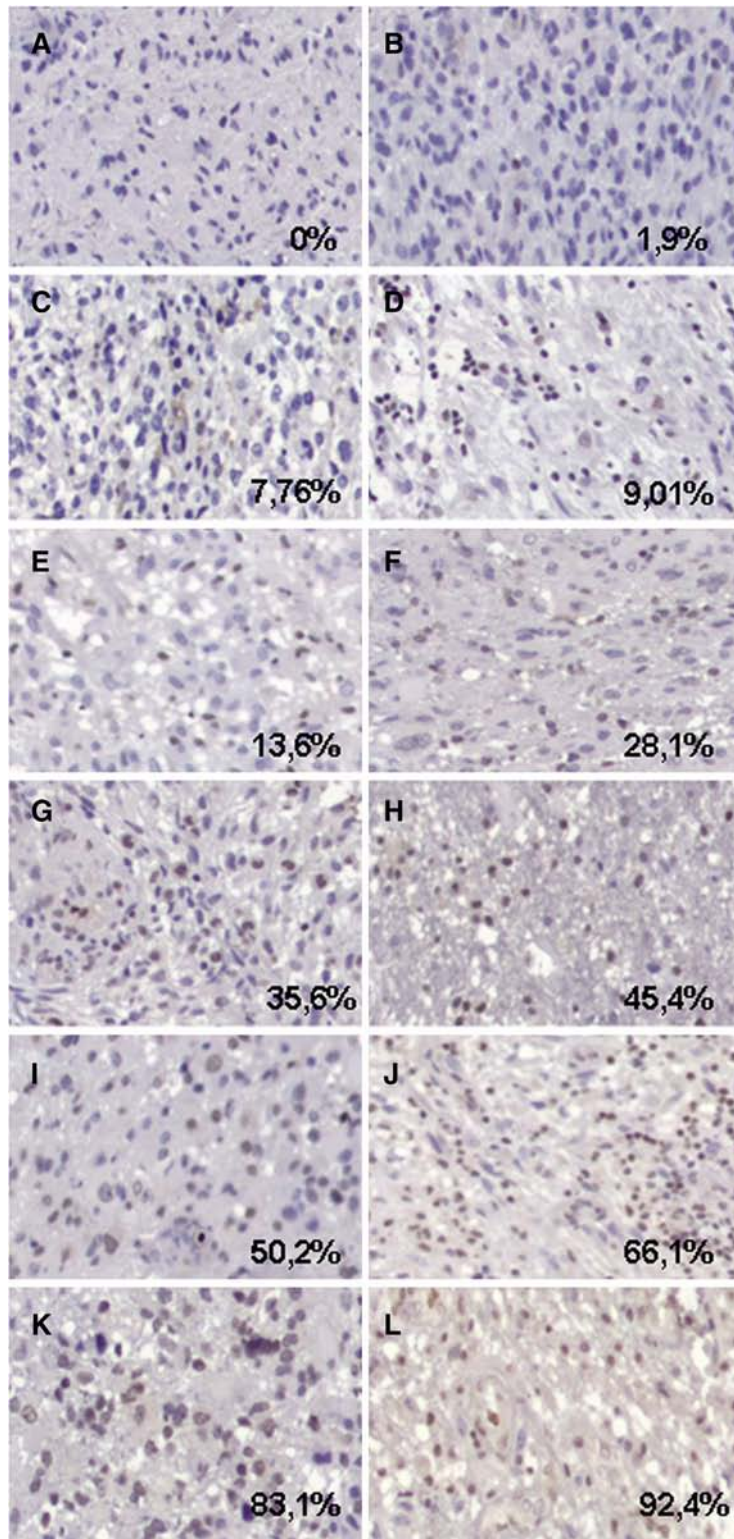


Figure 2 Representative photomicrographs illustrating different percentages of MGMT-stained tumor cells scored as +/− (A, B, C and D), 1+ (E), 2+ (F, G, H and I), 3+ (J, K and L) (see Methods) (20×).

Table 2 Association of MGMT promoter methylation and MGMT and CD133 expression in human GBM

		Total	Methylated	Unmethylated	Not done
MGMT expression					
Low-expression	+/-,+	42(55.3%)	20(26.3%)	22(29%)	2(2.6%)
High-expression	++,+++	34(44.7%)	14(18.4%)	20(26.3%)	
CD133 expression					
Low-expression	+/-,+	41(54.7%)	16(21.3%)	25(33.4%)	3(4%)
High-expression	++,+++	34(45.3%)	18(24%)	16(21.3%)	

Data are represented as the percentage of the total of analyzed patients.

evolution after recurrence [27]. Rivera et al. [28] demonstrated that MGMT promoter methylation was a predictor of survival in GBM treated exclusively with radiotherapy. In addition, a randomized phase III trial comparing standard adjuvant TMZ with a dose-dense schedule in newly diagnosed GBM confirmed the prognostic significance of MGMT methylation in GBM [29]. However, previous studies considered promoter methylation of the MGMT gene not to be a reliable prognostic factor of responsiveness to alkylating agents in glioblastomas [30]. Recent studies have also questioned the role

of promoter methylation status of MGMT in GBM. Yachi et al. [31] failed to establish this correlation in a large number of patients and showed that neither MSP-MGMT methylation nor immunohistochemical MGMT expression had prognostic implications in GBM patients. Similarly, Tang et al. [32] did not find a correlation between progression-free survival and MGMT promoter methylation in Chinese patients. In this context, we conducted a retrospective study in a homogeneous series of patients diagnosed with GBM treated with radiotherapy and concurrent temozolomide using MSP, which has

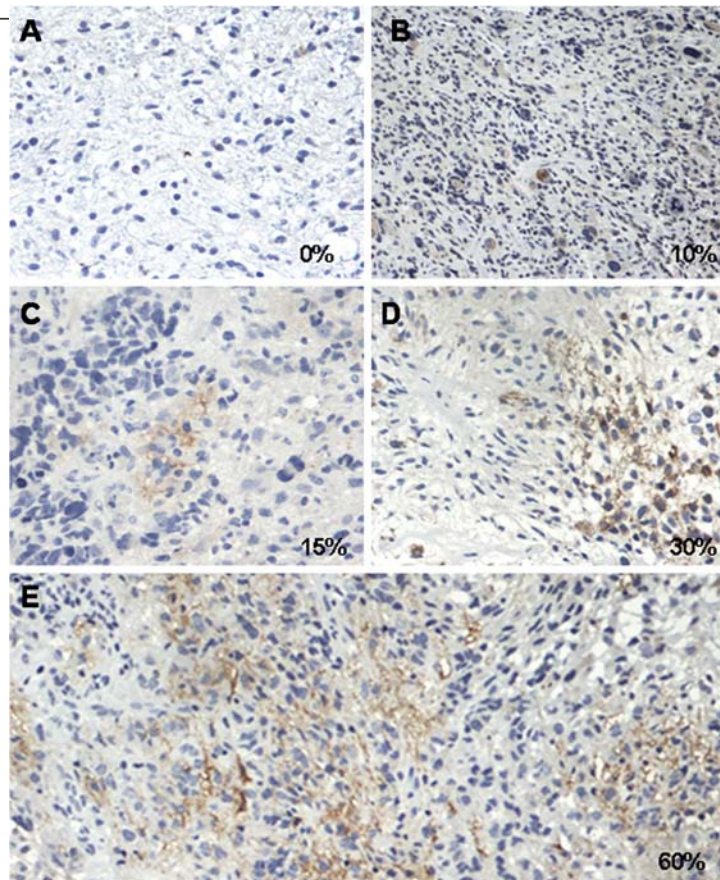


Figure 3 Representative photomicrographs illustrating different percentages of CD133-stained tumor cells corresponding to being scored as +/- (A), 1+ (B and C), 2+ (D), 3+ (E) (see methods) (20x).

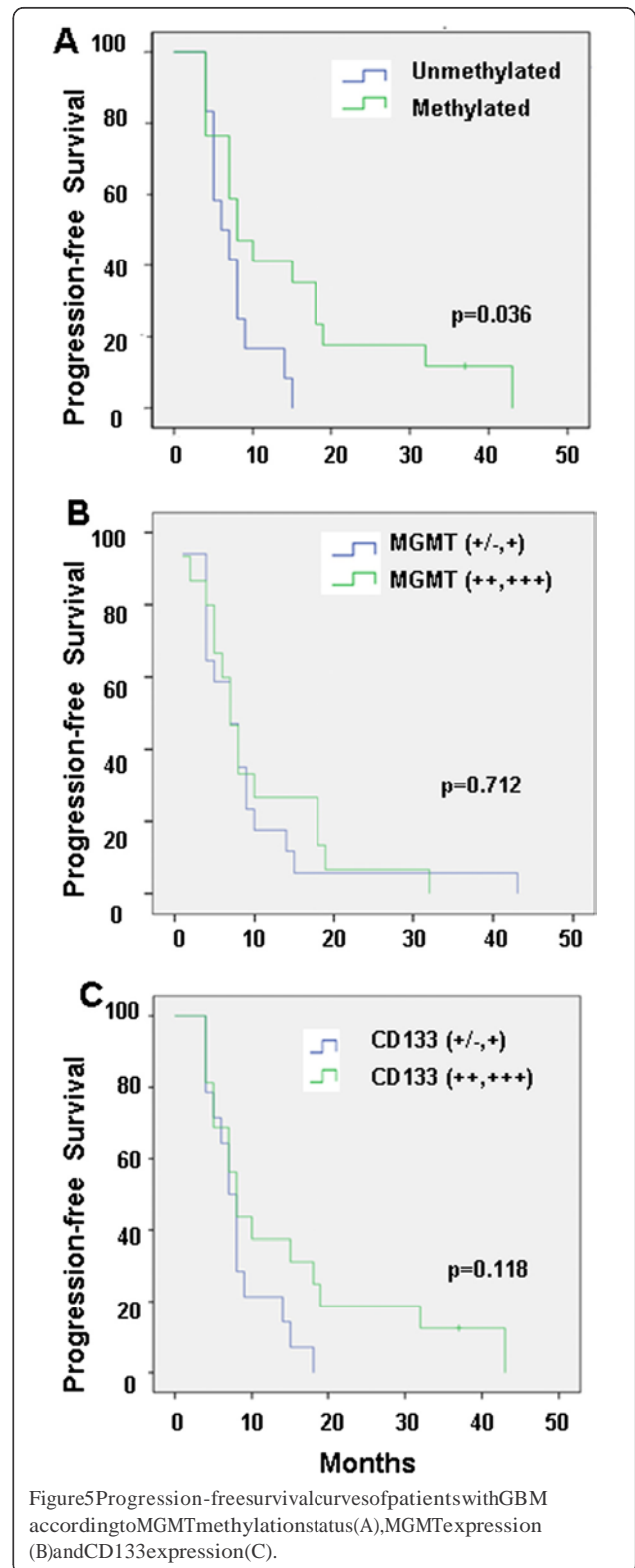
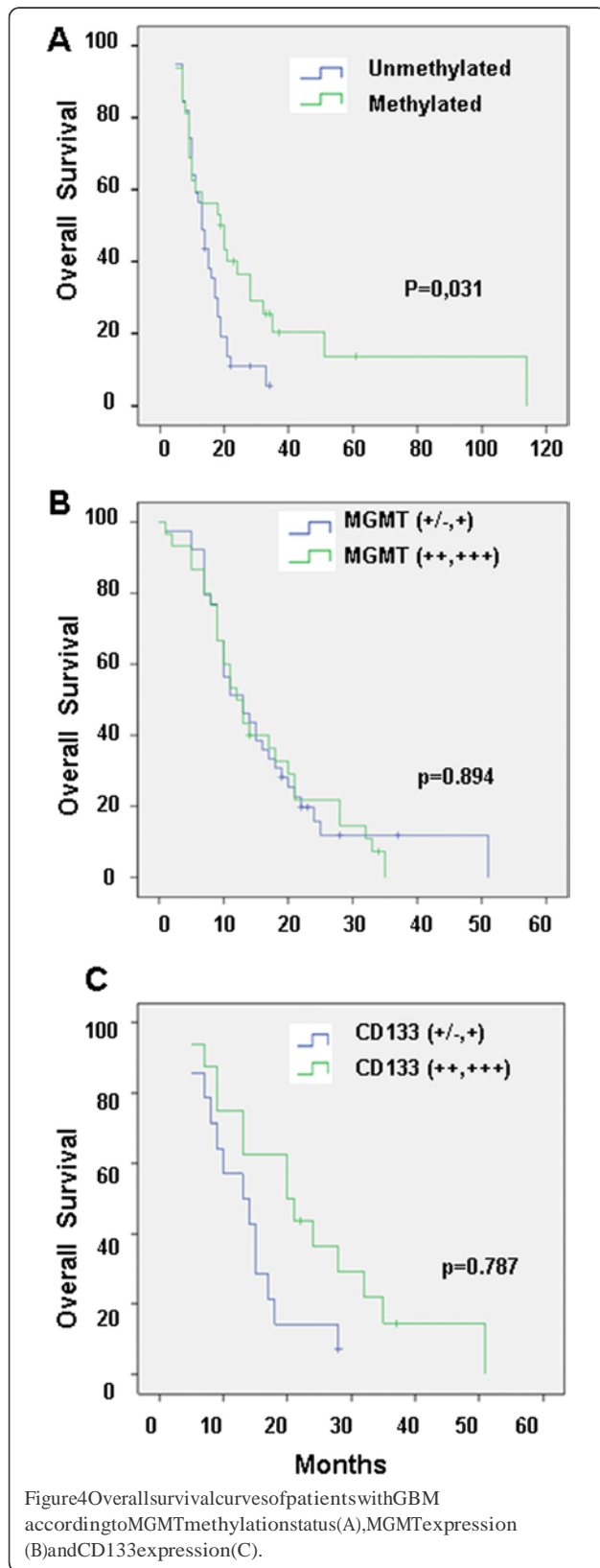


Table 3 Radiologic response of GBM patients following Macdonald et al. [17]

MGMT	Radiologic response	
	Negative	Positive
Unmethylated	33 (82.5%)	7 (17.5%)
Methylated	17 (56.7%)	13 (43.3%)
Total	50 (71.4%)	20 (28.6%)

The methylation of MGMT showed a significant correlation with radiologic response ($p < 0.05$).

been proposed as the most convenient technique in clinical routine diagnostics [33]. We found that the percentage of methylation of the MGMT promoter to be higher than that reported by Hegi et al. [4] but similar to those reported by other authors [22, 34]. The MGMT methylation status was clearly confirmed as an independent prognostic factor of GBM PFS and OS. In addition, patients with a methylated MGMT promoter status had higher response rates to TMZ and radiation therapy compared to those with a non-methylated status, so that MGMT methylation was a predictive factor for radiologic response.

On the other hand, the association between MGMT protein expression and promoter methylation in vivo has been widely discussed. Several studies have reported a significant association of high MGMT expression and poor prognosis of patients [7-10, 35-38]. We analyzed the expression of MGMT by immunohistochemistry using a digital quantitative method to avoid observer variability [39]. Our study clearly showed no correlation between MGMT expression and MGMT promoter methylation, supporting the finding observed by Rodriguez et al. [40] and Uno et al. [41], or overall survival or radiologic

Table 4 Modulation of MGMT promoter methylation

MGMT	MGMT	CD133	MGMT	MGMT	CD133
Promoter	Promoter		Promoter	Promoter	
Patient 1	M+++M+/-+		Patient 2	M+++U+++/-	
			Patient 3	U++++U+++	
Patient 4	M+++M+++		Patient 5	M+++U++	
			Patient 6	U++M++	
Patient 7	U++U++++		Patient 8	M+++U+++	
			Patient 9	U+/-+--	
Patient 10	U+/-+U++++		Patient 11	M+++M++++	

MGMT and CD133 in recurrent GBM before and after treatment with radiotherapy and temozolomide.

response coinciding with those findings of Preusser et al. [11]. The regulation of the MGMT gene is a complex phenomenon in which promoter hypermethylation is one of the factors that influence the final expression of the protein. In this context, the recent demonstration that there is discordance between MGMT promoter methylation and levels of MGMT mRNA expression suggests that other mechanisms may regulate the expression of this enzyme [42]. It also possibly suggests that promoter methylation and expression alone are not sufficient to provide information on the expected clinical course in patients with malignant glioma who receive chemotherapy with alkylating agents. In fact, a comprehensive study undertaken by sequencing the MGMT gene promoter has shown a strong correlation between the methylation site and treatment response [43].

CD133, a five-transmembrane cell surface protein found in human stem cells from various sources including the central nervous system [44], has been proposed to detect GBM CSCs. Considering the inherent resistance of CSCs to chemotherapy and radiotherapy [14, 15], it has been hypothesized that the clinical outcome will be inversely related to the presence of CSC-marker-positive cells. However, the impact of the presence of CSC in the clinical progression of tumors is unknown. Few studies exploring the prognostic value of CD133 expression as a marker of CSC in GBM have been undertaken; most were heterogeneous and used different methods (QRT-PCR, immunohistochemistry, FACS) so that comparisons are difficult. Intense CD133 expression was detected in high-grade oligodendroglial tumors [45] and in grade II-IV gliomas [46], both with poor prognoses. Similar results were found in grade IV gliomas where CD133 expression was related to OS and PFS [47]. Murat et al. [48] provided evidence that the glioblastoma stem cell phenotype (including CD133 expres-

patients survival. In a study with very homogeneous samples of GBM, high expression of CD133 was found to be an unfavorable prognostic factor [49]. In addition, an *in vitro* study using CSC obtained from 44 GBM patients to evaluate CD133/Ki67 expression by immunohistochemical analysis, concluded that CD133+ was correlated to survival [50]. However, the same authors demonstrated that high expression of CD133 was associated with a better prognosis when detected by FACS scan [51]. Similar results were previously found by Jo et al. [52] who described CD133 as a favorable prognostic factor for GBM. In this context, our study clearly demonstrates that CD133 has no implication in the prognoses of GBM patients supporting similar results of Kim et al. [53]. Finally, the prognostic impacts of variations of MGMT promoter methylation or MGMT and CD133 protein expression after treatment, are

not known. A previous study determined that MGMT methylation status has no prognostic value after GBM recurrence [27]. Our preliminary study in samples obtained before and after treatment from only ten patients with recurrent GBMs suggested that there are no differences between the analyzed variables although the low number of patients does not allow to obtain statistically significant conclusions.

Conclusions

Our study was designed to analyze the correlations between clinical features, MGMT status (promoter methylation and gene expression) and CD133 expression, and outcome in a set of patients uniformly treated with concomitant and adjuvant TMZ and chemoradiation. In this homogeneous series, the prognostic significance of MGMT promoter methylation has been clearly demonstrated. However, MGMT protein expression showed no correlation with MGMT promoter methylation. In addition, CD133 expression was correlated neither with the survival of patients with GBM nor with MGMT. In light of our data, together with the controversies reported in the literature, further studies are warranted to clarify whether MGMT and CD133 can discriminate between biologically distinct groups of GBM.

Abbreviations

AGT: O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase; CSC: Cancer stem cell; DAB: 3,3'-diaminobenzidine; GBM: Glioblastoma; MGMT: O⁶-Methylguanine-DNA-methyltransferase; OS: Overall survival; PCR: Polymerase chain reaction; PFS: Progression-free survival; TMZ: Temozolamide.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CM, JP and AA participated in the project design, coordination of the experiments, and manuscript preparation. RO, JA and FR carried out bisulfite treatment and methylation-specific PCR. AC, PJ and RL carried out immunohistochemical analysis. BG and RM participated in the collected and analyzed the clinical data. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (IS) through Project no. PI11/01862 and by the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía through Project no. PI-0338.

Author details

¹Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Granada 18100, Spain. ²Department of Anatomy and Embryology, University of Granada, Granada 18012, Spain. ³Service of Medical Oncology, Virgen de las Nieves Hospital, Granada 18014, Spain. ⁴Department of Health Science, University of Jaén, Jaén 23071, Spain. ⁵Anatomopathological Service, Virgen de las Nieves Hospital, Granada 18014, Spain. ⁶Department of Biomedical Science - Histology, University of Sassari, Sassari, Italy. ⁷National Institute of Biostructures and Biosystems, INBB, Sassari, Italy.

Received: 21 October 2012 Accepted: 10 December 2012

Published: 17 December 2012

References

- Quick A, Patel D, Hadzi Ahmetovic M, Chakravarti A, Mehta M: Current therapeutic paradigms in glioblastoma. *Rev Recent Clin Trials* 2010, **5**: 14–27.
- Brennan J, Margison GP: Reduction of the toxicity and mutagenicity of alkylating agents in mammalian cells harboring the Escherichia coli alkyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**: 6292–6296.
- Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, Vanden Bent MJ, Wick W, Hegi ME: MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2010, **6**: 39–51.
- Hegi ME, Diserens C, Gorla T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirmanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R: MGMT gene silencing and benefit from temozolamide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005, **352**: 997–1003.
- Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S: Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol* 2012, **108**: 11–27.
- Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Fukushima S, Kayama T, Shibui S: Pathological findings and prognostic factors in recurrent glioblastomas. *Brain Tumor Pathol* 2012. doi: 10.1007/s10014-012-0084-2.
- Nakasu S, Fukami T, Baba K, Matsuda M: Immunohistochemical study for O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in the non-neoplastic and neoplastic components of gliomas. *J Neurooncol* 2004, **70**: 333–334.
- Cao VT, Jung TY, Jung S, Jin SG, Moon KS, Kim Y, Kang SS, Park CS, Lee KH, Chae HJ: The correlation and prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas. *Neurosurgery* 2009, **65**: 866–875.
- Nakagawa T, Ido K, Sakuma T, Takeuchi H, Sato K, Kubota T: Prognostic significance of the immunohistochemical expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein-1 in glioblastomas. *Neuropathology* 2009, **29**: 379–388.
- Sonoda Y, Yokosawa M, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Tominaga T: O(6)-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma. *Int J Clin Oncol* 2010, **15**: 352–358.
- Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, Reifenberger G, Hamou MF, Diserens AC, Stupp R, Gorla T, Marosi C, Heinzl H, Hainfellner JA, Hegi M: Anti-O⁶-methylguanine methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as a clinical biomarker. *Brain Pathol* 2008, **18**: 520–532.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman L: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001, **414**: 105–111.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB: Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003, **63**: 5821–5828.
- Liu L, Yuan X, Zeng Z, Tunic P, Ng H, Abdulkadir R, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS: Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006, **5**: 67–78.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006, **444**: 756–760.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of glioma to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000, **343**: 1350–1354.
- Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, Cairncross JG: Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol* 1990, **8**: 1277–1280.
- Stupp R, Mason WP, Vanden Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorla T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirmanoff RO: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolamide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005, **352**: 987–996.
- Cairncross JG, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Mehta M, Curran W: 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**: 2707–2714.

20. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, Vanden Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO: Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma: a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009, 10: 459–466.
21. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reyes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, Garcia-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ, Balana C, Sanchez-Cespedes M, Garcia-Villanueva M, Arribas L, Esteller M: CpG island hypermethylation of the DNAREPAIR enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 4933–4938.
22. Criniere E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, Lejeune J, Auger N, Benouaich-Amiel A, Everhard S, Mokhtari K, Polivka M, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Thillet J, Sanson M: MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on the therapeutic modalities. *J Neurooncol* 2007, 83: 173–179.
23. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Ninkovic H, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, Von Deimling A, Loeffler M: 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.
24. Minniti G, Salvati M, Arcella A, Buttarelli F, D'Elia A, Lanzetta G, Esposito V, Scarpino S, Maurizi Enrici R, Giangaspero F: Correlation between O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in elderly patients with glioblastoma treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. *J Neurooncol* 2011, 102: 311–316.
25. Kim YS, Kim SH, Cho J, Kim JW, Chang JH, Kim DS, Lee KS, Suh CO: MGMT gene promoter methylation as a potential prognostic factor in glioblastoma treated with temozolomide-based chemoradiotherapy: a single-institution study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.12.086.
26. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Sotti G, Frezza G, Amista P, Morandi L, Spagnoli F, Ermani M: Recurrence pattern after temozolomide concomitant with and adjuvant radiotherapy in newly diagnosed patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status. *J Clin Oncol* 2009, 27: 1275–1279.
27. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Bartolini S, Bacci A, Agati R, Ghimenton C, Turazzi S, Talacchi A, Skrap M, Marucci G, Volpin L, Morandi L, Pizzolotto S, Gardiman M, Andreoli A, Calbucci F, Ermani M: O⁶-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status as a change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Neuro Oncol* 2010, 12: 283–288.
28. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, Bekele BN, Aldape KD: MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010, 12: 116–121.
29. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi M, Jaeckle KA, Armstrong TS, Wefel JS, Won M, Blumenthal DT, Mahajan A, Schultz CJ, Erridge SC, Brown PD, Chakravarti A, Curran WJ, Mehta MP: RTOG 0525: a randomized phase III trial comparing standard adjuvant temozolomide (TMZ) with dose-dense (dd) schedule in newly diagnosed glioblastoma (GBM) [abstract]. *J Clin Oncol* 2011, 29: suppl: abstr 2006.
30. Blanc JL, Wager M, Guilhot J, Kusy S, Bataille B, Chantereau T, Lapierre F, Larsen CJ, Karayan-Tapon L: Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. *J Neurooncol* 2004, 68: 275–283.
31. Yachi K, Watanabe T, Ohta T, Fukushima T, Yoshino A, Ogino A, Katayama Y, Nagase H: Relevance of MGMT assay for the detection of MGMT promoter hypermethylation in glioblastomas. *Int J Oncol* 2008, 33: 469–475.
32. Tang K, Jin Q, Yan W, Zhang Y, You G, Liu Y, Jiang T: Clinical correlation of MGMT protein expression and promoter methylation in Chinese glioblastoma patients. *Med Oncol* 2012, 29: 1292–1296.
33. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, Wick W, Weiler M: Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PLoS One* 2012, 7: e33449.
34. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B, Walker C: Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer* 2009, 101: 124–131.
35. Chinot OL, Barrie M, Fuentes S, Eudes N, Lancelot S, Metellus P, Muracciole X, Braguer D, Ouafik L, Martin PM, Dufour H, Figarella-Branger D: 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.
36. Nakasu S, Fukami T, Jito J, Matsuda M: Prognostic significance of loss of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase expression in supratentorial diffuse low-grade astrocytoma. *Surg Neurol* 2007, 68: 603–608.
37. Capper D, Mittelbronn M, Meyermann R, Schittenhelm J: Pitfalls in the assessment of MGMT expression and its correlation with survival in diffuse astrocytomas: proposal of a feasible immunohistochemical approach. *Acta Neuropathol* 2008, 115: 249–259.
38. Watanabe R, Nakasu Y, Tashiro H, Mitsuya K, Ito I, Nakasu S, Nakajima T: 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 Pathol* 2011, 28: 127–135.
39. Azaï Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Shono T, Amano T, Nakamizo A, Suzuki SO, Iwaki T, Sasaki T: Quantitative digital assessment of MGMT immunohistochemical expression in glioblastoma tissue. *Brain Tumor Pathol* 2011, 28: 25–31.
40. Rodriguez FJ, Thibodeau SN, Jenkins RB, Schwalter KV, Caron BL, O'Neill BP, James CD, Passe S, Slezak J, Gianni C: MGMT immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008, 16: 59–65.
41. Uno M, Oba-Shinjo SM, Camargo AA, Moura RP, Aguiar PH, Cabreira HN, Begnami M, Rosemberg S, Teixeira MJ, Marie SK: Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. *Clinics* 2011, 66: 1747–1755.
42. Kreth S, Thon N, Eigenbrog S, Lutz J, Ledderose C, Egenberger R, Tonn JC, Kretschmar HA, Hinske LC, Kreth FW: O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation. *PLoS One* 2011, 6: e17156.
43. Shah N, Lin B, Sibenaller Z, Ryken T, Lee H, Yoon JG, Rostad S, Foltz G: Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: correlation with MGMT expression and clinical response in GBM. *PLoS One* 2011, 6: e16146.
44. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman L: Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 14720–14725.
45. Beier D, Wischhusen J, Dietmaier W, Hau P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP: CD133 expression and cancer stem cell prediction in high-grade oligodendroglial tumors. *Brain Pathol* 2008, 18: 370–377.
46. Zhang M, Song T, Yang L, Chen R, Wu L, Yang Z, Fang J: Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2008, 27: 85–92.
47. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichten P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC: Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 2008, 14: 123–129.
48. Murat A, Migliaiavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, de Tribolet N, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MC, Hainfellner JA, Heppner FL, Dietrich PY, Zimmer Y, Cairncross JG, Janzer RC, Domany E, Delorenzi M, Stupp R, Hegi ME: Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 2008, 26: 3015–3024.
49. Metellus P, Nanni-Metellus L, Delfino C, Colin C, Tchogandjian A, Coulibaly B, Fina F, Loundou A, Barrie M, Chinot O, Ouafik L, Figarella-Branger D: 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, 18: 2937–2945.
50. Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL, Signore M, Lombardi D, Todaro M, Stassi G, Martinini M, Maira G, Larocca LM, De Maria R: Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2008, 14: 8205–8212.

51. Pallini R, Ricci-Vitiani L, Montano N, Mollinari C, Biffoni M, Cenci T, Pierconti F, Martini M, De Maria R, Larocca LM: Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. *Cancer* 2011, 117:162–174.
52. Joo KM, Kim SY, Jin X, Song SY, Kong DS, Lee J, Jeon JW, Kim MH, Kang BG, Jung Y, Jin J, Hong SC, Park WY, Lee DS, Kim H, Nam DH: Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastoma. *Lab Invest* 2008, 88:808–815.
53. Kim KJ, Lee KH, Kim HS, Moon KS, Jung TY, Jung S, Lee MC: The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathology* 2011, 31:494–502.

doi: 10.1186/1479-5876-10-250

Cite this article as: Melguizo et al.: MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy. *Journal of Translational Medicine* 2012 10:250.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

