

Euskal Herriko Unibertsitatea / Universidad del País Vasco

Medikuntza eta Kirurgia doktorego-programa / Programa de Doctorado Medicina y Cirugía

**Doktorego tesia / Tesis Doctoral**



**MGMT PROMOTOREAREN METILAZIOAREN BALIO PRONOSTIKO ETA AURRESALEA TEMOZOLOMIDA BOTIKAREKIN ARTATU DIREN GOI GRADUKO GLIOMA DUTEN PAZIENTEENGAN. DONOSTIA UNIBERTSITATE OSPITALEKO ESPERIENTZIA.**

DETERMINACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO DE RESPUESTA A TEMOZOLOMIDA DE LA METILACION DEL PROMOTOR DE MGMT EN PACIENTES CON GLIOMAS DE ALTO GRADO TRATADOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE DONOSTIA.

Larraitz Egaña Otaño

2019



Euskal Herriko Unibertsitatea / Universidad del País Vasco

Medikuntza eta Kirurgia doktorego-programa / Programa de Doctorado Medicina y Cirugía

**Doktorego tesia / Tesis Doctoral**



**MGMT PROMOTOREAREN METILAZIOAREN BALIO PRONOSTIKO ETA AURREALEA TEMOZOLOMIDA BOTIKAREKIN ARTATU DIREN GLIOBLASTOMA MULTIFORMEDUN PAZIENTEENGAN. DONOSTIA UNIBERTSITATE OSPITALEKO ESPERIENTZIA.**

DETERMINACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO DE RESPUESTA A TEMOZOLOMIDA DE LA METILACION DEL PROMOTOR DE MGMT EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMAS MULTIFORMES TRATADOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE DONOSTIA.

**Zuzendariak / Directores:** Ander Matheu Fernández, Felix Zubia Olaskoaga

**Tutoreak / Tutoreak:** Eduardo Gonzalez Perez-Yarza, Felix Zubia Olaskoaga



**Nere familia eta lagunei,**

Eskerrik asko honaino iristen laguntzeagatik eta nigan fedea izateagatik



## ESKER ONAK

Lan honetan jende askok parte hartu du modu askotara eta guztiei nire eskerrik handienak eman nahiko nizkizueke.

Lehenik, gurasoei: etxean betidanik ikusi ditut ikerketa jardunetan; aitak medikuntzako historiaren inguruan tesina egin zuen eta oraindik gogoan dut Salamancara lagundu nion aste buru hura Sanchez Granjel historialariarengana, lanaren inguruan solas egitera. Nola aldatu diren gauzak harrez gero. Amak, ingeneritzako irakaslea izanda, materialeen inguruan egin zuen bere doktoretza. Beraiek piztu zuten nigan tesia noizbait egiteko asmoa. Asmoak azkeneko kajoian gordeta zeuden, baina nire lankideek bultzatu eta animatu ninduten kajoia irekitzera, batez ere Sarak eta Laurak; beraien jardunari esker, atzetik datozen gazte guztien grina eta gogoia eta zaharragoak direnen konstantziak lagunduta, zerbitzuaren inertzia aldatzen ari da eta ikerketarako eta lanerako talde geroz eta sendoagoa sortzen ari da.

Tesiaren garapenean, ezinbestekoa izan da gure ospitaleko eta Biodonostiako "neuroonkologia taldearen" talde lana, pazienteen datu basea sortuz eta elikatuz denen artean, gaur niretzako eta bihar zuretzako. Eskerrik asko zuei, batez ere Aneri, hor dagoelako beti, edozertarako prest eta Marianori, eskeini didan laguntzagatik eta eman didan animo guztiagatik.

Eskerrak eman nahi dizkiet, noski, nire zuzendariei, Anderri eta Felixi, eman dizkidaten aholkuengatik, egin dizkidaten zuzenketengatik, eduki duten pazientziagatik eta galduta sentitu naizen une horietan animatu eta orientatzeagatik.

A Cristina Sarasqueta por haberme ayudado tanto en el análisis estadístico como en la comprensión de algunos conceptos como en ordenar los resultados; ha estado ahí todas las veces que la he necesitado, que han sido muchas; sin ella, se me hubiera hecho muy cuesta arriba.

Gracias también a Eduardo Gonzalez Perez-Yarza por su disponibilidad y facilitación del trabajo.

Eskerrik asko bihotz bihotzez Iñakiri, senarrari, arlo guztiz ezberdin batetan lan eginda ere, ulertu eta animatu nauelako aurrera egitera. Eta nola ez, seme-alabei, Laia, Lizar eta Lurri, azken txanpan batez ere, "utzi amari lanean" entzuteaz kokoteraino bukatu dutela bait badakit, eta noski, ordenagailua neretzat hartuta.

Azkenik, eskerrak eman nahiko nizkieke, bereziki, pazienteei; hain gatxa den gaisotasun hau izanda ere, prest agertu baitira gure ospitaleko ikerketarako datu base honetan parte hartzera; beraiek gabe, lan hau ezin izango litzateke egin.

Pena txiki bat gelditu zait: nire asmoa euskaraz eta gazteleraz egitea zen, eta dena batera aurkeztea. Ezinezkoa izan zait eta aurreragorako utziko dut.





**INDICE DE TABLAS DE LA INTRODUCCION**

Tabla 1 .....	34
Tabla 2 .....	48

**INDICE DE TABLAS DE LOS RESULTADOS**

Tabla 3 .....	71
Tabla 4 .....	72
Tabla 5 .....	73
Tabla 6 .....	74
Tabla 7 .....	75
Tabla 8 .....	76
Tabla 9 .....	77
Tabla 10 .....	80
Tabla 11 .....	82
Tabla 12 .....	84
Tabla 13 .....	88
Tabla 14 .....	89
Tabla 15 .....	91

**INDICE DE FIGURAS DE LA INTRODUCCION**

Figura 1 .....	35
Figura 2 .....	39
Figura 3 .....	40
Figura 4 .....	43
Figura 5 .....	45
Figura 6 .....	47
Figura 7 .....	49
Figura 8 .....	50

## **INDICE DE FIGURAS DE LOS RESULTADOS**

Figura 9 .....	73
Figura 10 .....	76
Figura 11 .....	77
Figura 12 .....	78
Figura 13 .....	79
Figura 14 .....	80
Figura 15 .....	81
Figura 16 .....	83
Figura 17 .....	84
Figura 18 .....	85
Figura 19 .....	86
Figura 20 .....	87
Figura 21 .....	88
Figura 22 .....	89
Figura 23 .....	90
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>117</b>

## **INDICE GENERAL**

<b>RESUMEN / LABURPENA.....</b>	<b>27</b>
<b>1 INTRODUCCION .....</b>	<b>31</b>
1.1 CARACTERISTICAS DE LOS GLIOBLASTOMAS MULTIFORMES .....	33
1.2 GLIOMAGENESIS .....	37
1.3 ALTERACIONES GENETICAS INCORPORADAS A LA PRACTICA CLINICA .....	41
1.4 CLASIFICACION MOLECULAR DE LOS GLIOMAS .....	42
1.5 MGMT .....	43
Función de MGMT .....	44
Hipermetilación de MGMT .....	45
Regulación de MGMT .....	46
Implicaciones de la metilación de MGMT.....	47

Determinación de la metilación de MGMT.....	49
1.6 GLIOBLASTOMA Y EDAD .....	50
<b>2 HIPOTESIS .....</b>	<b>53</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>61</b>
4.1 DISEÑO .....	63
4.2 PERIODO DE INCLUSION DE LOS PACIENTES.....	63
4.3 CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION .....	63
4.4 RECOGIDA DE DATOS .....	63
4.5 VARIABLES INCLUIDAS .....	63
4.6 TRATAMIENTO .....	66
4.7 SEGUIMIENTO Y EVALUACION DEL PACIENTE .....	66
4.8 DETERMINACION DE LA PROGRESION DE ENFERMEDAD .....	66
4.9 ANALISIS ESTADISTICO .....	67
4.10 CONSIDERACIONES ETICAS .....	67
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
5.1 ESTABLECIMIENTO DE LA COHORTE DE LOS PACIENTES CON GLIOBLASTOMA .....	71
5.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESION Y SUPERVIVENCIA GLOBAL.....	72
5.3 ANALISIS DE LA METILACION DE MGMT .....	73
5.4 ASOCIACION DE LAS DIFERENTES VARIABLES ANALIZADAS CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN O RECAIDA (SLP).....	75
5.4.1 Asociación de la metilación de MGMT con la SLP.....	75
5.4.2 Asociación del tratamiento con la SLP .....	76
5.4.3 Asociación del número de ciclos de TMZ con la SLP .....	77
5.4.4 Asociación del estado general con la SLP.....	78
5.4.5 Asociación del tipo de cirugía con la SLP.....	79
5.4.6 Asociación de la edad con la SLP.....	80
5.4.7 Análisis multivariante de la SLP.....	81

5.5. ASOCIACION DE LAS DIFERENTES VARIABLES ANALIZADAS CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG).....	83
5.5.1 Asociación de la metilación de MGMT con la SG.....	83
5.5.2 Asociación del tratamiento con la SG.....	83
5.5.3 Asociación del número de ciclos de TMZ con la SG.....	84
5.5.4 Asociación del estado general con la SG.....	85
5.5.5 Asociación del nivel cognitivo con la SG.....	86
5.5.6 Asociación del tipo de cirugía con la SG.....	87
5.5.7 Asociación de la edad con la SG.....	88
5.5.8 Asociación de la edad con la metilación de MGMT y con la SG.....	89
5.5.9 Análisis multivariante de la SG.....	90
<b>6 DISCUSION.....</b>	<b>93</b>
6.1 SUPERVIVENCIA DE LA COHORTE Y TRATAMIENTO.....	95
6.2 IMPACTO DE LA METILACION DEL PROMOTOR MGMT EN LA COHORTE DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DONOSTIA.....	97
6.3 RELACION DEL IMPACTO DE LA METILACION DEL PROMOTOR DEL MGMT CON LA EDAD EN LA COHORTE DEL HOSPITAL DONOSTIA.....	99
6.4. RELACION DEL IMPACTO DE LA METILACION DEL PROMOTOR DEL MGMT CON OTROS FACTORES GENETICOS EN LA COHORTE DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DONOSTIA.....	100
6.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	101
6.6 LINEAS DE FUTURO.....	102
<b>7 CONCLUSIONES.....</b>	<b>105</b>
<b>8 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>111</b>





## RESUMEN / LABURPENA

**Introducción:** El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor primario más frecuente del sistema nervioso central (SNC). El padecimiento de esta enfermedad conlleva en muchos casos que los pacientes estén muy incapacitados tanto a nivel físico como cognitivo. El pronóstico de estos tumores es infausto: con el actual tratamiento estándar – que consiste en cirugía seguida de radioterapia y quimioterapia con temozolomida- la supervivencia mediana ha mejorado de 12 a 15 meses, aunque la mayoría de los pacientes progresan en los primeros meses y la supervivencia a 5 años no llega al 10%. La supervivencia es aún peor para los pacientes mayores de 65 años, pues apenas llega a los 5 meses. La metilación del promotor del gen precursor de la enzima O6-metilguanina –DNA-metiltransferasa (MGMT) ha demostrado en diferentes estudios la ganancia en supervivencia en aquellos pacientes tratados con temozolomida. La enzima MGMT está involucrada en la reparación del DNA dañado por los agentes alquilantes y si su promotor está metilado, no hay suficiente MGMT y la sensibilidad del tumor a los agentes alquilantes es mayor. Sin embargo, la toma de decisiones en base al estado del MGMT está introducido en la práctica clínica habitual solo en la población mayor de 65 años y no en todos los centros.

**Objetivo:** En este estudio, hemos querido analizar si la determinación del estado de metilación del promotor de MGMT es un factor pronóstico y/o predictivo de respuesta al tratamiento con temozolomida en los pacientes con gliomas de alto grado tratados en el Hospital Universitario Donostia.

**Material y Métodos:** Para ello hemos diseñado un estudio retrospectivo y observacional sobre muestras patológicas de gliomas de alto grado del Hospital Universitario Donostia. En ellas, se ha realizado el análisis de la metilación de MGMT y para ello, se han utilizado 2 técnicas dependiendo del momento en el que se hizo el análisis: la PCR metilación específica y la pirosecuenciación.

**Resultados:** Nuestra cohorte incluyó a 334 pacientes entre enero de 2003 y julio de 2017. La supervivencia global (SG) fue de 12 meses y en la población mayor de 65 años de 6 meses. La SG fue significativamente mejor en los pacientes que recibieron algún tipo de tratamiento complementario a la cirugía (15 meses versus 2 meses). Se pudo realizar la determinación de la metilación de MGMT en el 31,9% de la muestra; en esta población, el 48,5% de los pacientes tenían la MGMT metilada. La SG en los pacientes con la metilación fue de 14 meses y en los no metilados de 12 meses . En la población mayor de 65 años, la SG en los pacientes con la metilación fue de 11 meses frente a 6 meses en los que no lo tenían metilado , aunque este resultado no fue estadísticamente significativo. Con respecto a la respuesta obtenida en relación al tratamiento con temozolomida, la SG fue de 16 meses tanto en la población con la MGMT metilada como en la que no lo tenían metilada .

**Conclusiones:** Por tanto, podemos concluir que en nuestra cohorte la metilación de MGMT no tiene valor pronóstico ni predictivo, tanto en la población general como en los mayores de 65 años.

**Sarrera:** Glioblastoma multiformea (GBM) nerbio sistema zentraletako tumore primario ohikoena da. Gaixo hauek, egunerokotasunerako ezintasuna izaten dute sarritan eta honek, ondorio oso kaltegarriak eduki ditzake, bai paziente berarengan, bai pazientearen familiarterako edo giza ingurunean. Pronostikoa oso txarra da: egunean dagoen tratamendu estandarra emanda – lehenik ebakuntza eta ondoren, erradioterapia eta kimioterapia temozolomida deritzon botikarekin– biziraupena hobetu egin da 12 hilabetetik 15era; hala ere, paziente gehienetan, gaitzak lehenengo 6-9 hilabetetan aurrera egiten du eta 5 urtetararteko biziraupena ez da %10era heltzen. 65 urtetik gorako pazienteetan are okerragoa da, biziraupena 5 hilabete baina gutxiagokoa izaten baita. MGMT (O6-metilguanina-ADN-metiltransferasa) entzimaren gen aintzindariaren promotore guneak metilazioa izateak, ikerketa ezberdinetan erakutsi du biziraupena hobetzen duela temozolomidarekin trataturiko pazienteetan. Entzima honek botika alkilanteek ADNarengan sortzen duten kaltearen konponketan hartzen du parte eta bere promotorea metilatuta badago, ez dago MGMT nahikoa eta botika alkilanteenganako tumorearen sentsibilitatea handiagoa da. Hala ere, MGMTaren metilazioan oinarritutako tratamenduaren inguruko erabaki hartzea 65 urtetik gorako pazienteetan dago bakarrik onartuta, eta ez ospitale guztietan.

**Helburua:** Lan honetan, gure ospitalean MGMTak duen balio pronostiko eta auresalea aztertu dugu.

**Materiale eta metodoak:** Horretarako, atzera begirako eta behaketako ikerketa diseinatu dugu. Horretarako, Donostia Unibertsitate Ospitaleko goi graduako gliomen lagin patologikoak erabili ditugu. Lagin horietan, MGMTaren metilazioaren azterketa egin da bi teknika eberdin erabiliz, azterketa egin zen garaiaren arabera: PCR metilazio espezifikoa eta pirosekuenziazioa.

**Emaitzak:** Gure kohortea, 2003ko urtarrila eta 2017 uztailearen artean jasota, 334 pazienteek osatzen zuten. Biziraupen orokorra 12 hilabetetakoa izan zen eta 65 urtetik gorakoetan 6 hilabetetakoa. Biziraupen orokorra hobea izan zen ebakuntzaz gain beste tratamenduren bat jaso zuten pazienteetan (15 hilabetetakoa tratamendua jaso zutenetan) jaso ez zutenetan baino (2 hilabete). MGMTaren metilazioaren zehaztapena, gure laginaren % 31,9 kasutan egin ahal izan zen eta hauetako % 48,5ek zuten MGMTa metilatuta. Metilazioa zuten pazienteetan biziraupen orokorra 14 hilabetetakoa izan zen eta metilatu gabekoetan 12 hilabetetakoa. 65 urtetatik gorako adin taldean biziraupen orokorra 11 hilabetetakoa izan zen MGMTa metilatuta zuten pazienteetan eta 6 hilabetetakoa metilatu gabekoetan, emaitza hau estatistikoki esanguratsua izan ez bazen ere. Temozolomida jaso zuten pazienteen artean, biziraupena 16 hilabetetakoa izan zen, bai MGMTa metilatuta zuten pazienteetan, bai metilatuta ez zutenetan.

**Ondorioak:** Gure kohortean MGMTaren metilazioak ez du balio pronostiko edo auresalerik, ez populazio orokorrean, ezta 65 urtetik gorako adin tartean ere.







# **1.INTRODUCCION**



## 1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS GLIOBLASTOMAS MULTIFORMES

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor primario más frecuente del SNC (sistema nervioso central); corresponde al 12-15% de todos los tumores intracraneales y al 50-60% de todos los gliomas<sup>1</sup>. Su incidencia presenta una tendencia a incrementarse, debido en parte a una mayor longevidad de la población. La incidencia en EEUU por ejemplo, según una publicación reciente es de 4,4 por 100.000 habitantes y año<sup>2</sup>, y suponen aproximadamente un 1,4% del total de casos de cáncer diagnosticados.

En la Comunidad Autónoma Vasca (CAV), según los datos cedidos por EPIC (European Prospective Investigation of Cancer) - Gipuzkoa Osasun Publikoko Zuzendariordetza / Subdirección de Salud, en el periodo 2010-2014 el total de tumores malignos diagnosticados fue de 68.836, 21.711 de ellos en Gipuzkoa. Los tumores cerebrales malignos diagnosticados en la CAV para este periodo fueron 1.059, de los cuales 357 corresponden a casos de Gipuzkoa. De estos 1.059 casos, 498 resultaron ser GBMs (170 casos en Gipuzkoa), que suponen el 43,5 % del total de tumores cerebrales (el 47% de los malignos), el 58,3 % del total de gliomas y el 0,7% del total de tumores diagnosticados durante ese periodo. La tasa bruta de GBMs en la CAV fue de 4,6 (x100.00) y la tasa ajustada por edad (TAE) de 4,6 (población estándar Europea 2013). Si nos centramos en Gipuzkoa, la tasa bruta de GBMs resultó ser de 4,8 (x100.000) y TAE de 4,8 (población estándar Europea 2013). Por lo tanto, estamos en unos ratios similares a los de EEUU.

En cuanto a la edad de presentación, los tumores del SNC muestran una distribución bimodal, con un pico en la edad pediátrica y un aumento progresivo de la incidencia en los adultos, hasta alcanzar su máximo entre la sexta y la séptima década de la vida; en el caso de los GBMs, la mediana de edad al diagnóstico es de 64 años<sup>1</sup>.

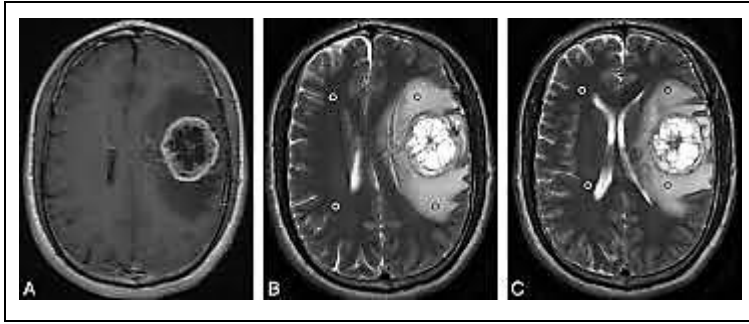
El único factor de riesgo claramente establecido para el desarrollo de tumores primarios del SNC es la exposición a radiaciones ionizantes terapéuticas. El porcentaje de casos asociados a enfermedades genéticas conocidas es inferior al 5% de los casos, aunque también se ha descrito agregación familiar en pacientes con gliomas, apuntando a la existencia de polimorfismos genéticos predisponentes a su desarrollo<sup>3</sup>.

La correcta clasificación y gradación histológica de los tumores primarios del sistema nervioso permite una primera aproximación a su comportamiento biológico y pronóstico y al establecimiento de la indicación terapéutica. Desde su primera publicación en 1979, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye un sistema de gradación histológica que constituye hoy en día el sistema más empleado<sup>3</sup>; de acuerdo a ella, los gliomas se dividen en 4 grados, siendo el GBM un tumor grado IV debido a su malignidad<sup>4</sup> (tabla 1). La última clasificación actualizada de la OMS ha sido publicada en el año 2016<sup>4</sup>. Esta última clasificación incorpora además de los criterios histológicos, criterios moleculares para clasificar a los gliomas, que pretende reflejar mejor la biología tumoral así como su evolución clínica, supervivencia y respuesta al tratamiento<sup>4</sup>.

**Tabla 1.** Clasificación WHO de los gliomas en función del grado<sup>4</sup>

<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV
Glioblastoma, IDH-mutant	IV
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	IV
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III
<b>Other astrocytic tumours</b>	
Pilocytic astrocytoma	I
Subependymal giant cell astrocytoma	I
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III
<b>Ependymal tumours</b>	
Subependymoma	I
Myxopapillary ependymoma	I
Ependymoma	II
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III
Anaplastic ependymoma	III
<b>Other gliomas</b>	
Angiocentric glioma	I
Chordoid glioma of third ventricle	II

Los pacientes con GBMs suelen presentar signos y síntomas neurológicos subagudos que progresan durante días o semanas; esta clínica varía dependiendo de la localización del tumor en el cerebro<sup>3</sup>. La resonancia magnética (RM) cerebral es la prueba radiológica obligatoria para el diagnóstico, ya que pone de manifiesto una masa cerebral que capta contraste y que orienta el diagnóstico; sin embargo, es preciso el diagnóstico histológico para distinguir un glioma de alto grado de otros tumores cerebrales primarios o metastásicos<sup>3</sup>. Además, el diagnóstico histológico proporciona material para el estudio molecular de estos tumores, que nos puede dar información pronóstica y en algunos casos, nos puede ayudar a decidir el tratamiento.



**Figura 1** – Imagen de un GBM en una resonancia magnética

El pronóstico de estos tumores es infausto y si no se tratan, fallecen en pocos meses. La supervivencia mediana ha mejorado de 12 a 15 meses, aunque la mayoría de los pacientes progresan en los primeros 6 – 9 meses. La supervivencia a 2 años no llega al 30% y menos del 10% sobrevive a los 5 años. Además, el padecimiento de esta enfermedad conlleva en muchos casos que los pacientes estén muy incapacitados tanto a nivel físico como cognitivo, lo cual puede tener consecuencias devastadoras tanto en el propio paciente como en su entorno familiar y social.

Como ya se ha reseñado antes, la mitad de los pacientes afectados de GBM tiene > 64 años al diagnóstico, siendo su supervivencia mucho peor que en el resto de rango de edades, ya que se reduce a 4-5 meses según estudios poblacionales<sup>5</sup>. De hecho, junto con el estado general, a día de hoy, la edad es el factor pronóstico más importante en cuanto a supervivencia se refiere<sup>2</sup>. Las razones para un peor pronóstico a mayor edad pueden tener que ver con una biología tumoral menos favorable, realizar un tratamiento menos intensivo, mayor toxicidad secundaria a tratamientos por tener menos reserva fisiológica, comorbilidades asociadas<sup>5</sup>...

El tratamiento inicial para estos tumores, siempre que estén en una localización accesible es la resección quirúrgica<sup>1</sup>. El objetivo primordial es una resección lo más amplia posible intentando preservar la función neurológica. La evidencia que disponemos sugiere que la máxima resección quirúrgica posible se asocia a una mejoría del estado funcional y a un aumento de la supervivencia<sup>6,7</sup>. Aunque está por definir cual es la máxima resección quirúrgica óptima, la cirugía citorreductora sigue siendo el eje principal del tratamiento de los GBMs<sup>6,7</sup>.

Durante más de tres décadas, la cirugía seguida de la radioterapia fue el tratamiento estándar de estos tumores; el análisis conjunto de 6 estudios aleatorizados de radioterapia versus no radioterapia tras cirugía, demostraron un beneficio significativo para la radioterapia. Sin embargo, este aumento en supervivencia a favor de la radioterapia era pequeño y apenas había largos supervivientes (supervivencia a 3 y 5 años de 4,4 y 1,9% )<sup>8</sup>.

Aunque la quimioterapia con nitrosoureas, solas o en combinación, ya demostró tener un impacto modesto en la supervivencia global de estos pacientes en la década de 1970 y 1980<sup>9</sup>, los resultados obtenidos con la cirugía y radioterapia permanecieron prácticamente invariables hasta principios de este siglo, cuando se publicó el estudio llevado a cabo por el Instituto Nacional del Cáncer de Canadá (NCIC) y por la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC)<sup>10</sup>; en este estudio, el añadir quimioterapia oral con temozolomida (TMZ), un agente alquilante, concomitante y adyuvante a la radioterapia

aumentaba la supervivencia de 12 a 15 meses. Es más, la TMZ en adyuvancia aumentó el número de largos supervivientes; un 8% de los pacientes estaban vivos a los 5 años<sup>11</sup>. Así pues, el actual tratamiento estándar de primera línea consiste en cirugía seguida de radioterapia y quimioterapia con TMZ<sup>11</sup>.

La TMZ es un profármaco de un agente citotóxico alquilante. A pH fisiológico, sufre una rápida conversión para formar el metabolito activo, la monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC). Los efectos citotóxicos de MTIC implican la alquilación (metilación) del ADN en varios lugares de la guanina. La formación de O [6]-metilguanina inhibe la replicación del ADN y causa la muerte celular a través de la estimulación de la proteína p53. La TMZ es un inhibidor del ciclo celular no específico, teniendo lugar la detención del ciclo celular entre las fases G2-y M. La resistencia a la TMZ puede ser debida a la sobreexpresión de la enzima de reparación del ADN, (6]-metilguanina ADN-metil transferasa) y la pérdida de reparación del ADN. Aunque no se ha comparado directamente con las nitrosoureas en un ensayo clínico con GBMs de nuevo diagnóstico, la magnitud del beneficio que se ha observado con ella en estudios por separado es mayor que la observada con las nitrosoureas. Además su perfil de toxicidad y tolerabilidad es también mejor.

En cualquier caso, como ya se ha reseñado antes, la mayoría de los tumores recaen pronto. El panorama de los GBMs cuando recurren es desolador; históricamente, se trataban con agentes quimioterápicos alquilantes (antes de la incorporación de la TMZ al tratamiento de primera línea), pero apenas había ensayos comparativos al respecto y las publicaciones solían ser de serie de casos y la supervivencia global una vez que recaían era de entre 3 y 6 meses<sup>12, 13</sup>.

El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal diseñado para reconocer e inactivar al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)- una proteína que circula en la sangre y estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos-. Este anticuerpo, al unirse al VEGF, impide que las células cancerosas desarrollen sus propios medios de suministro de sangre y, por tanto, que obtengan oxígeno y nutrientes, lo cual frena la propagación del cáncer. Es por tanto, lo que denominamos un fármaco antiangiogénico y está autorizado en la Unión Europea (UE) desde el 12 de enero de 2005 para utilizarlo, combinado con otros medicamentos de quimioterapia, para tratar ciertos cánceres (colon o recto, ovario, etc.)<sup>14</sup>. Este fármaco, demostró que podía tener cierta actividad en los GBM en recaída; en ensayos fase 2 no aleatorizados se obtuvieron unos resultados en supervivencia libre de progresión y supervivencia global de 6 y 9 meses respectivamente<sup>15,16</sup>, con un aumento de la supervivencia en algunos casos espectacular. Un ensayo fase 3 en recurrencia de GBMs<sup>17</sup>, demostró que el añadir bevacizumab al agente quimioterápico lomustina reducía el riesgo de progresión o muerte en un 48% y en base a este estudio, la FDA (Food & Drugs Agency), la agencia americana del medicamento, lo aprobó para el tratamiento del GBM en la indicación de recurrencia; en Europa, sin embargo, la EMA (European Medicines Agency), la Agencia Europea de Medicamentos, no lo tiene aprobado en esta indicación<sup>18</sup> y hay que pedirlo como uso fuera de ficha técnica. Debido a los resultados obtenidos en GBMs en recurrencia, también se ha probado en primera línea asociado al tratamiento estándar actual en 2 ensayos clínicos fase 3<sup>19,20</sup>; aunque el impacto en supervivencia libre de progresión fue significativo en uno de ellos, los resultados en supervivencia global no tuvieron el beneficio esperado (probablemente, en parte porque a la progresión se permitía el uso del fármaco) por lo que tampoco se autorizó en esta indicación<sup>18</sup>.



Aunque se han probado y se están probando cientos de moléculas con diferente mecanismo de acción, todos ellos han fracasado en el intento de mejorar la supervivencia y la calidad de vida de nuestros pacientes <sup>21</sup>, ningún otro fármaco además de la TMZ ha conseguido mejorar de forma contundente los resultados y la supervivencia. Además, no tenemos factores claros que nos hagan predecir quienes son los pacientes en los que puede funcionar el fármaco, que no está exento de cierta comorbilidad (toxicidad hematológica fundamentalmente a expensas de plaquetopenia, que en el 5%-10% de los casos puede llegar a ser severa y prolongada, neumonía atípica por *Pneumocystis jiroveci* sobre todo en aquellos pacientes que llevan además glucocorticoides y están recibiendo radioterapia,..)

## 1.2 GLIOMAGENESIS

Hasta hace bien poco, los GBMs se clasificaban en primarios o secundarios en base a determinadas características clínicas<sup>22</sup>. Los GBMs primarios, el 90% de todos ellos, se llamaban así porque aparecen *de novo*, sin que exista un tumor previo de menor grado de malignidad; los GBMs secundarios, el 10% de todos los GBMs, se desarrollan a partir de un astrocitoma anaplásico (grado III) o de un astrocitoma de bajo grado y su pronóstico, en general, es mejor.

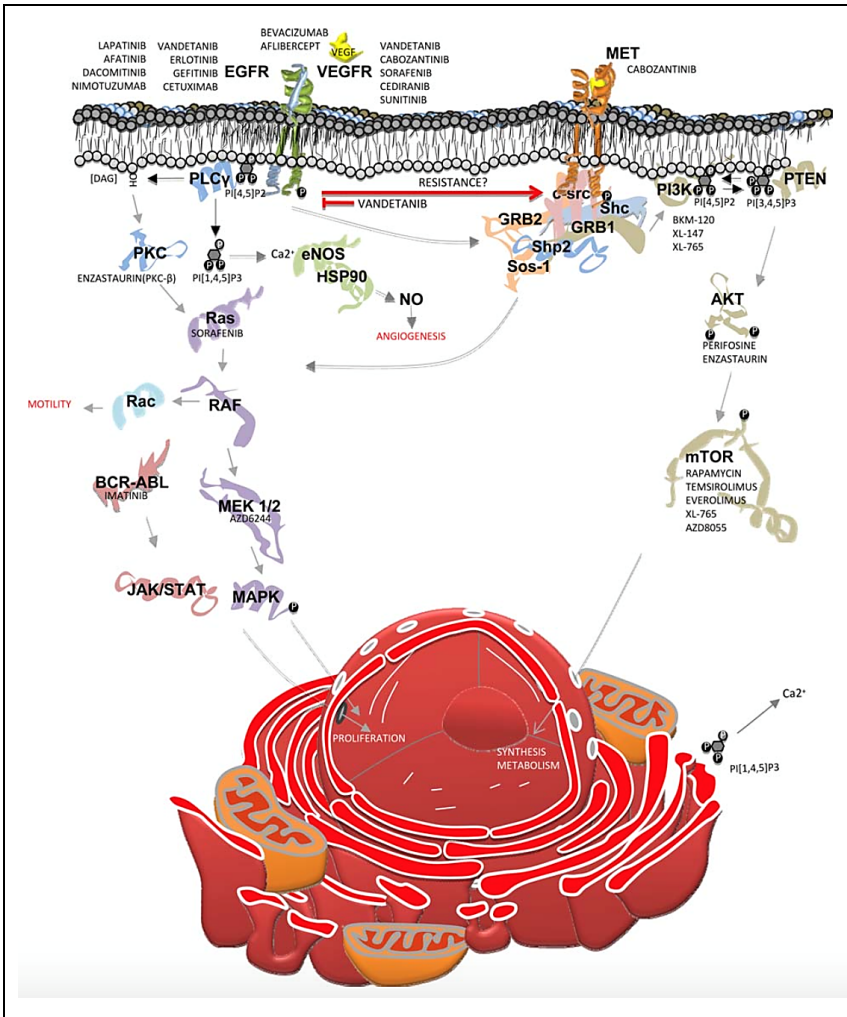
En los últimos años, fruto de la investigación en torno a la biología de los gliomas, se han descubierto cientos de alteraciones moleculares y mutaciones genéticas, de significado incierto en cuanto al valor pronóstico, predictivo o como diana terapéutica en muchos casos. Se cree que algunas de estas alteraciones están implicadas en la gliomagénesis y en base a ellas se han establecido diferentes subgrupos de tumores con características clínicas y biológicas totalmente diferentes. Dentro de cada subgrupo tumoral, además, la variabilidad de expresión de estas alteraciones es alta de una célula a otra, lo que provoca una aún mayor heterogeneidad intratumoral <sup>23</sup> y supone un desafío aún mayor para hallar terapias dirigidas eficaces.

Esta explosión de datos genéticos y epigenéticos ha sido posible en gran medida por los avances tecnológicos que han permitido estudiar el genoma a ese nivel. En conjunto, toda esta información ha ayudado a entender mejor el entorno del glioma y a ir descubriendo las rutas que están alteradas en esta enfermedad <sup>24</sup>.

Entre las alteraciones genéticas, tres son particularmente remarcables, porque se producen precozmente en la formación de gliomas: 1p 19q, IDH1 o IDH2 y TERT <sup>24</sup>. Por otro lado, la hipermetilación de las islas CpG provoca la silenciación epigenética de muchos genes, entre ellos los supresores tumorales y parece que también está implicada en la génesis del cáncer<sup>25</sup>.

En esa lucha de intentar avanzar en el conocimiento de la biología de los gliomas, es de destacar la labor llevada a cabo por el Cancer Genome Atlas (TCGA), un proyecto gubernamental estadounidense que ha ido recogiendo datos “multiplataforma” de más de 500 muestras de GBMs, incluidos datos de micro-RNA, RNA mensajero, polimorfismos de nucleótido único y de secuenciación de exoma. En uno de los estudios de TCGA <sup>26</sup> con plataformas de secuenciación y arrais, analizaron 601 genes seleccionados previamente de 91 muestras pareadas (tejido normal/ tejido tumoral) para determinar datos de expresión génica, aberraciones en la metilación de DNA, alteraciones en el número de copias de DNA (delecciones o amplificaciones) y de expresión de RNA codificadora y no codificadora. En

conjunto, los resultados de esta investigación apoyaron la hipótesis de que al menos 3 rutas de señalización estaban alteradas en todos o casi todos los GBMs: la vía Rb/p16, la vía de p53, y la vía de las Tirosin Kinasas (fosfoinositol 3-kinasa (PI3K)/AKT/fosfatasa, PTEN/mTOR y la del receptor tirosin kinasa (RTK)/RAS/RAF/MEK/MAPK). Daños genéticos específicos en los RTK-s que participan en las vías de señalización RAS y PI3K incluyen mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en el receptor del factor de crecimiento de plaquetas (PDGFR) y MET. La ruta del p53 se desregula entre otros motivos por deleciones de la kinasa inhibidora 2A dependiente de ciclinas (CDKN2A) y amplificaciones en MDM2 (de sus siglas en inglés “murine doble minute 2”) y MDM4 (“murine doble minute 4”) -genes que codifican las proteínas del mismo nombre y que son importantes reguladores negativos de p53-, además de por las propias mutaciones en p53. El evento más frecuente en la vía de RB es la deleción de CDKN2A en el cromosoma 9p21 seguido de la amplificación de la kinasa 4 dependiente de ciclinas (CDK4)<sup>21</sup>. El gen CDKN2A codifica 2 proteínas diferentes (p16INK4a y p14ARF) , ambos supresores tumorales que regulan el ciclo celular. En aproximadamente 55% de los GBMs están delecionados. La proteína p14ARF promueve la degradación del represor de p53 (MDM2), permitiendo la estabilización y acumulación de p53; por lo tanto, la pérdida de p14ARF (vía deleción de CDKN2a) tiene como consecuencia la supresión de p53 y activa por lo tanto, un mecanismo para la tumorigénesis. La otra proteína que codifica el gen CDKN2A, la p16INK4A, inhibe la asociación de CDK 4/6 (ciclina dependiente de kinasa) con la ciclina D. Esta asociación forma un complejo que funciona para promover la transición G1/S vía activación de mediadores “downstream”; este complejo, fosforila una proteína supresora tumoral, la proteína retinoblastoma (pRb), facilitando la transición G1/S. Una pérdida de p16INK4a permite la asociación de de CDK 4/6 con la ciclina D y por tanto, promueve la transición G1/S. La p16INK4a actúa por tanto, como supresor tumoral<sup>21</sup>. El estudio antes mencionado del grupo TCGA<sup>26</sup> confirmó también la existencia de mutaciones ligadas a GBMs en los genes PI3KR1 y NF-1.

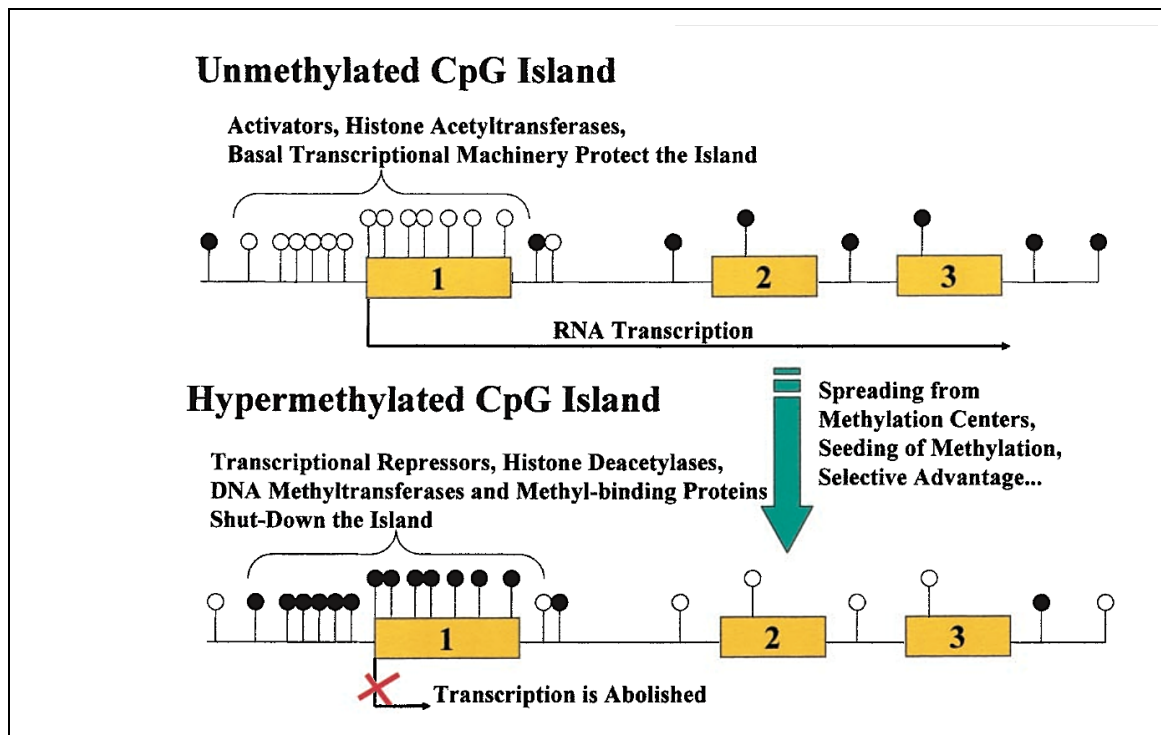


**Figura 2<sup>21</sup>.** Vías de señalización alteradas en los gliomas; EGFR, receptor de factor de crecimiento epidérmico; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GRB1, proteína de union 1 del receptor del factor de crecimiento; HSP90, heat shock proteína 90; JAK, Janus kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; PTEN, phosphatase and tensin homolog; Shp2, small heterodimer partner 2; Sos-1, son of sevenless 1; STAT, signal transducer and activa- tor of transcription; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

Paralelamente, Parson y colaboradores<sup>27</sup> secuenciaron 20661 genes codificadores de proteína en 22 muestras tumorales de humanos y se identificaron las mismas vías como las más frecuentemente desreguladas en GBMs. Además, identificaron por primera vez la mutación en IDH.

Con todos estos datos, Verhaak<sup>28</sup> estableció cuatro subgrupos de GBMs en base a las alteraciones moleculares diferenciales de cada grupo: Proneurales, neurales, mesenquimales y clásicos. Posteriormente, otros grupos han realizado estudios similares con diferentes metodologías con el mismo objetivo. Los subtipos proneurales y mesenquimales son las firmas que más concuerdan de unos estudios a otros. El proneural se caracteriza por un mejor pronóstico y sobreexpresa genes asociados con el desarrollo normal del cerebro y la neurogénesis. El subtipo mesenquimal, por el contrario, está estrechamente relacionado con perfiles de expresión de alta proliferación celular y tiene mal pronóstico

Los sitios CpG o CG son regiones de DNA donde el nucleótido citosina se sigue del nucleótido guanina en una secuencia lineal de bases en dirección 5' -> 3'. CpG se debe de interpretar como citosina en el extremo 5' seguido de guanina en el extremo 3' y no al revés, porque entonces sería GpC .



**Figura 3**<sup>25</sup> La isla CpG típica de un gen supresor tumoral en una célula normal y en una célula tumoral. La presencia de la hipermetilación cambia completamente su entorno molecular. Bolitas blancas: CpGs no metilados; Bolitas negras: CpGs metilados.

Las islas CpG son regiones con una alta frecuencia de sitios CpG y en el genoma humano, suelen estar al comienzo del gen<sup>29</sup> en la región del promotor. De esta forma, la presencia de la metilación de los sitios CpG en el promotor de un gen puede inhibir su expresión o silenciarlo; por contra, la hipometilación se ha asociado a sobreexpresión de oncogenes en las células tumorales<sup>29</sup>.

La hipermetilación de CpG en el promotor afecta a genes que participan en el ciclo celular (p16, p15, Rb, p14,...), en la reparación de DNA ( BRCA1, hMLH1, MGMT), en la adherencia celular, en el metabolismo carcinogénico, en la apoptosis,... La inactivación epigenética de todos estos genes supresores hace pensar que todos ellos son importantes en la génesis del cáncer, porque cambian todo el entorno genético de la célula<sup>30</sup>.

Se han identificado alteraciones en la metilación del DNA de manera frecuente en gliomas humanos, incluido la hipermetilación de las islas CpG asociadas al promotor, que por lo general es más frecuente en GBMs secundarios que en primarios<sup>31</sup>.

Recientemente, se ha identificado el fenotipo metilador de las islas CpG (fenotipo G-CIMP) en un subgrupo de gliomas/glioblastomas (GBM), lo que ha servido para denominar este grupo en base a esta característica epigenética. Los G-CIMP en gliomas están asociados a gliomas de bajo grado sobre todo y a GBMs secundarios; es un fenotipo estable que no cambia a lo largo de la enfermedad (si G-CIMP + al diagnóstico también lo es en la recurrencia). Está estrechamente asociada a la mutación de IDH-1 y tiene un valor pronóstico positivo en supervivencia independientemente del estado de mutación de IDH. Los GBMs con fenotipo G-CIMP+ son tumores que carecen de alteraciones en el número de copias que se ven

habitualmente en los GBMs (amplificación de EGFR, ganancias en el cromosoma 7 y pérdidas en el 10) y sin embargo, suelen tener alteraciones presentes en los gliomas IDH mutados. Son más frecuentes en los GBMs con perfil proneural y dentro de éstos, son un subgrupo diferente: su evolución clínica es más favorable que la de otros subgrupos. Parece que este perfil más benigno se debe a que se silencian genes mesenquimales fundamentales: genes que son parte activa en la invasión tumoral, en la matriz extracelular, en el mesénquima,..<sup>31</sup>. En general la hipermetilación ocurre en unos loci concretos del gen y no de forma global en todos los CpG del genoma, acción también observada en los cánceres de colon<sup>32</sup>.

Por otro lado, la edad tiene un fuerte efecto en los niveles de metilación en los sitios CpG, lo que se define como reloj epigenético o edad de metilación del DNA; esta actividad es mayor en el tejido tumoral que en el sano<sup>33</sup>.

A pesar del beneficio de estos estudios en cuanto a la comprensión biológica y molecular del GBM, la información y los subgrupos planteados no se han transferido a la práctica clínica y no se realiza diagnóstico ni se establece pronóstico en base a estas alteraciones.

### **1.3 ALTERACIONES GENETICAS INCORPORADAS A LA PRACTICA CLINICA**

Entre las alteraciones genéticas, tres son particularmente remarcables, porque se producen precozmente en la formación de gliomas: 1p 19q, IDH1 o IDH2 y TERT<sup>24</sup>.

La primera alteración en ser identificada fue la codelección de los brazos de los cromosomas 1p y 19q (codelección p1q19), que se asocia con la histología oligodendroglioma y su presencia predice una mayor sensibilidad del tumor a los agentes alquilantes<sup>24</sup>.

La segunda alteración en descubrirse fue la mutación en los genes IDH1 o 2, que no se corresponde con un tipo histológico concreto de glioma; se asocia con un metabolismo celular tumoral diferente<sup>24</sup>. Los genes IDH (isocitrato dehidrogenasa) codifican enzimas que toman parte en el ciclo de Krebs. La mutación en esta dehidrogenasa conlleva un acúmulo de 2-hidroxiglutarato y la inhibición de las deoxigenasas dependientes de ketoglutarato. Todos estos hechos se traducen en la inducción de un fenotipo hipermetilador. La mayoría de las mutaciones ocurren en IDH1 (codón R132) – 90%-. Está presente en el 65-80% de los gliomas difusos grados II y III y en el 80% de los GBMs hasta ahora llamados secundarios (el 5% del total de los GBMs)<sup>34</sup>. Su presencia tiene valor pronóstico en los gliomas de alto grado; la última clasificación de la OMS lo identifica como un estratificador muy importante dividiendo los gliomas de alto grado en IDH nativos o wild-type y mutados<sup>4</sup>.

La tercera alteración a destacar fue el hallazgo de la mutación en el promotor de TERT (del inglés “telomerase reverse transcriptase”), que codifica a la telomerasa<sup>24</sup>. Su mutación refuerza la actividad telomerasa y el alargamiento de telómeros, mecanismo que podemos observar tanto en los gliomas más agresivos (GBMs) como en los gliomas difusos menos agresivos (oligodendrogliomas). Este hecho sugiere que el mantenimiento de los telómeros parece una precondition necesaria para el desarrollo de tumores cerebrales. Los telómeros son secuencias de nucleótidos ricos en guanina que se sitúan en las terminaciones de cada cromatida; dan estabilidad al cromosoma y se acortan en cada división celular. Además de por la actividad de la telomerasa, el mantenimiento de la largura de los telómeros también puede producirse por el mecanismo denominado alargamiento alternativo de los telómeros (ALT), que se activa

cuando la proteína ATRX no se expresa porque su precursor está mutado. Este segundo mecanismo es excluyente de la mutación en el promotor de TERT y es poco frecuente en GBMs.

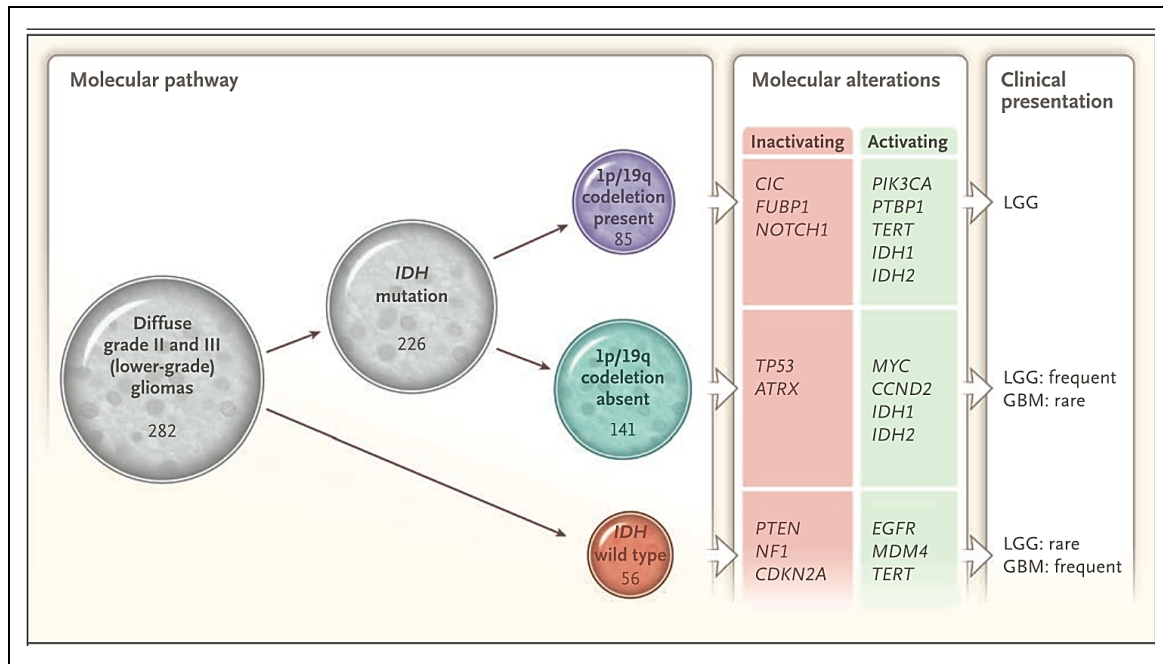
#### **1.4 CLASIFICACION MOLECULAR DE LOS GLIOMAS**

2 trabajos recientes enfocados sobre todo en gliomas difusos grados II y III<sup>24,35</sup> han conseguido demostrar que los gliomas son biológicamente diferentes unos de otros, con diferente comportamiento clínico; esta diferente biología se correlaciona más con las características moleculares que comparten o no que con las clase histológica. En base a estas alteraciones (mutación de IDH, codelección p1q19, mutación TERT, mutación ATRX), establecieron grupos moleculares de tumores diferentes que diferían en la edad al diagnóstico, supervivencia y asociación con variantes de línea germinal, lo cual implica que tienen diferentes mecanismos de patogénesis. Uno de los trabajos halló que los grupos moleculares estaban independientemente asociados con la supervivencia global en los pacientes con glioma grado II o III, pero no en los gliomas grado IV o glioblastomas<sup>24</sup>.

En el caso de los glioblastomas (GBM), el 90% son IDH wild type o no mutados; éstos, son los ya reseñados antes como primarios o de novo y la edad de los pacientes que lo sufren habitualmente es de más de 55 años. El pronóstico es peor que el de los IDH mutados. Estos, parece que son gliomas de bajo grado en su inicio y que en unos años evolucionan a GBMs. En un pequeño porcentaje, pueden presentar mutaciones en IDH y en TERT; estos GBMs IDH mutados TERT mutados tienen muy mal pronóstico. De ahí que no siempre la presencia de mutación IDH en los GBMs es un factor favorable, aunque en la mayoría de los casos lo es. En los pacientes con gliomas IDH mutados, tanto si son difusos grados II o III como si son GBMs, la edad al diagnóstico es significativamente más temprana (menores de 40 años).

Los gliomas difusos IDH wild type son poco frecuentes. Aunque sean de bajo grado, el perfil mutacional y de alteraciones en el número de copias se asemeja al de los GBMs IDH wild type y no al resto de gliomas de bajo grado. Suelen presentar mutaciones en PTEN, EGFR, NF1, TP53 y PI3K y es muy frecuente que tengan ganancias en el cromosoma 7 y deleciones en el cromosoma 10. Pueden tener o no la mutación en TERT. Es probable que sean precursores inmediatos de los GBMs.

Los gliomas con mutación en TERT son pacientes más mayores, son sobre todo GBMs, y en el caso de éstos, son los que peor supervivencia tienen de forma significativa. Según estos autores, quizás más adelante, dé más información pronóstica si se estratifican en función del estatus de EGFR.



**Figura 4<sup>35</sup>. Resumen de los mayores hallazgos moleculares:** Se hallaron 3 grupos muy sólidos fuertemente correlacionados con la mutación IDH y el estado de codelección de 1p/19q; estos grupos tenían alteraciones moleculares esteretípicas y subtipo-específicas y su presentación clínica también fue diferente de un grupo a otro. GBM: glioblastoma. LGG: glioma de bajo grado

### 1.5 MGMT

A pesar de que durante todos estos años se han hecho avances en el diagnóstico y estratificación de los GBMs gracias a la investigación de la biología de estos tumores, el impacto que esto ha tenido en la mejoría de su pronóstico ha sido prácticamente nulo. Las numerosas moléculas inhibitoras de vías de proliferación o de señales de transducción que se han probado, han fracasado hasta la fecha como tratamiento contra los GBMs.

Afortunadamente, no todos son sombras, y la identificación de la metilación del promotor de MGMT como factor predictivo de respuesta al tratamiento con agentes alquilantes ha marcado un antes y un después en la neurooncología translacional<sup>30,36,37</sup>. El enzima MGMT (O6-metilguanina –DNA-metiltransferasa) está involucrado en la reparación del DNA dañado y si su precursor está metilado, no hay suficiente MGMT y la sensibilidad a los agentes alquilantes es mayor. Esta alteración molecular ha motivado mucha investigación por su implicación directa con la TMZ desde que Esteller y sus colaboradores<sup>30</sup> lo describieran como factor predictivo de respuesta a este fármaco; posteriormente, en el estudio desarrollado por la EORTC y el grupo Canadiense en el que la TMZ aumentaba la supervivencia con respecto a solo intervenir y radioterapia<sup>10</sup>, se vio que la supervivencia a 2 años de los pacientes con tumores que tienen metilado el promotor de MGMT que se trataron con TMZ aumentaba casi 5 veces respecto a los que no tenían esta característica<sup>36</sup>. En este ensayo, ya de entrada se planificó analizar si el estatus de metilación de MGMT tenía algún papel en la respuesta a la TMZ. De los 573 pacientes incluidos en el estudio, se pudo determinar el estatus de metilación de MGMT en 206. En estos 206 pacientes, hubo una diferencia significativa en la supervivencia global independientemente del tratamiento recibido entre los pacientes que tenían la

metilación frente a los que no lo tenían, con una reducción del riesgo de mortalidad del 55% en los que tenían el MGMT metilado y una supervivencia mediana de 18.2 meses frente a 12.2 meses en aquellos que no tenían la metilación. Además, se objetivó que entre los pacientes que tenían el MGMT metilado, aquellos que recibieron TMZ y radioterapia tenían mejor supervivencia que los que solo hicieron radioterapia (21,7 meses frente a 15,3 meses). La supervivencia libre de progresión también fue el doble en este grupo (10,3 meses vs 5,9 meses).

Por tanto, la determinación del estatus de metilación de MGMT nos puede ayudar a seleccionar a aquellos pacientes que más se van a beneficiar de agentes alquilantes como la TMZ; pacientes cuyo tumor no tiene la metilación parece que se benefician poco de la TMZ.<sup>36</sup>

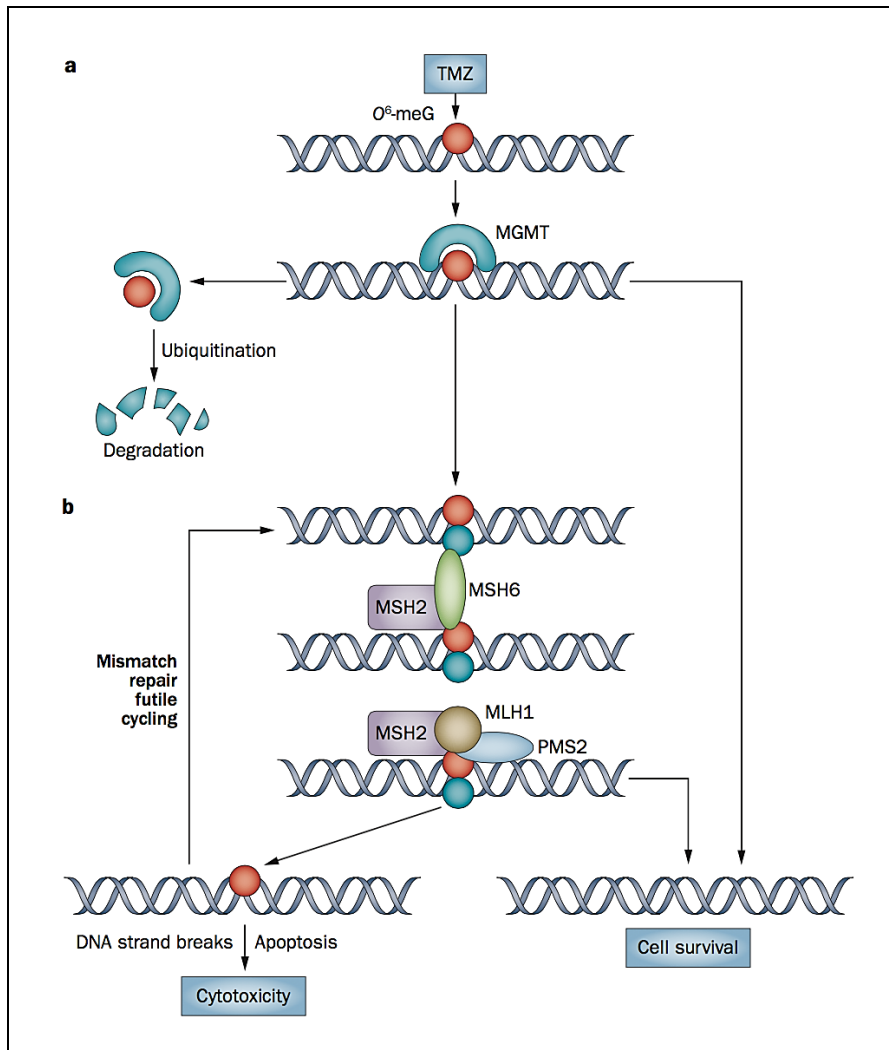
De hecho, la toma de decisiones en base al estado del MGMT se está implementando como práctica habitual sobre todo en los pacientes mayores de 65 años, en los que hay más evidencia en base a estudios específicos centrados en este factor y en la realización de un tratamiento u otro<sup>38,39,40</sup>.

### **1.5.1 Función de MGMT**

Tal y como he mencionado antes, el O6metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT) es un enzima involucrado en la reparación del DNA, eliminando el grupo alquilo de la posición O6 de la guanina, un sitio importante de alquilación de DNA<sup>36</sup>.

El tratamiento de los GBMs con agentes alquilantes contrarresta el efecto letal de éstos, eliminando aductos alquilo de la posición O6 de la guanina; una vez ejercida esta acción la enzima se inactiva de forma irreversible – proceso al que llamamos inhibición suicida. Cuando los agentes alquilantes de DNA generan aductos de O6 metilguanina de forma persistente, causa una alteración en el apareamiento de bases del DNA que se manifiesta como un defecto de reparación durante la replicación del DNA de la célula tumoral, se detiene el ciclo celular y la célula se muere. El daño inducido por la metilación puede ser revertida por el enzima MGMT. Esta reparación de la actividad del DNA tumoral genera resistencia contra los efectos citotóxicos de los agentes alquilantes<sup>41</sup>.





**Figura 5<sup>41</sup> Reparación mediada por MGMT.** La TMZ, quimioterápico alquilante, puede provocar potencialmente modificaciones citotóxicas en el DNA como por ejemplo la conversión de guanina a O<sup>6</sup>-meG (círculo rojo) que es corregido por la proteína MGMT. **a** / MGMT secuestra el grupo metilo del O<sup>6</sup>-meG y restaura la guanina a su estado normal. Este proceso hace que la MGMT quede permanentemente inactivada y se degrada mediante la ubiquitinación. **b**/ si un aducto DNA O<sup>6</sup>-meG no es reparado por la MGMT (p.ej debido a baja expresión de la proteína por la silenciamiento epigenético de MGMT) O<sup>6</sup>-meG forma par con timina (círculo azul) durante la replicación del DNA. El par de bases defectuoso O<sup>6</sup>-meG –timina es reconocido por la vía de reparación que incluye a las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 y se generan ciclos ineficaces de reparación para finalmente llegar a la muerte celular. Abreviaturas: MGMT, O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferasa; O<sup>6</sup>-meG, O<sup>6</sup>-metilguanina; TMZ, temozolomida.

### 1.5.2 Hipermetilación de MGMT

La hipermetilación de MGMT se observa en un 30-45 % de los glioblastomas<sup>36</sup>. Probablemente, como resultado de la metilación, disminuye la expresión del gen en su proteína en aquellas células tumorales que tienen el promotor de MGMT hipermetilado y por tanto, son más sensibles a la TMZ<sup>36,37</sup>. Sin embargo, el valor predictivo de la hipermetilación del promotor de MGMT para un mayor beneficio con tratamientos alquilantes solo se ha definido para GBMs; en el caso de gliomas anaplásicos, la hipermetilación del promotor de MGMT es un factor pronóstico positivo tanto si reciben radioterapia como si reciben quimioterapia. Probablemente, esta diferencia en el significado biológico de la metilación del promotor de MGMT no esté relacionada con el grado de malignidad, sino con la presencia o no de mutación de IDH en estos tumores<sup>42</sup>. La metilación del promotor de MGMT asociado a mutación de IDH y al fenotipo hipermetilador de islas CpG (fenotipo G-CIMP) no tiene el mismo significado que cuando la hipermetilación de MGMT sucede cuando no hay hipermetilación de islas CpG de por medio y por tanto, cuando el IDH no está mutado<sup>41</sup>.

### 1.5.3 Regulación de MGMT

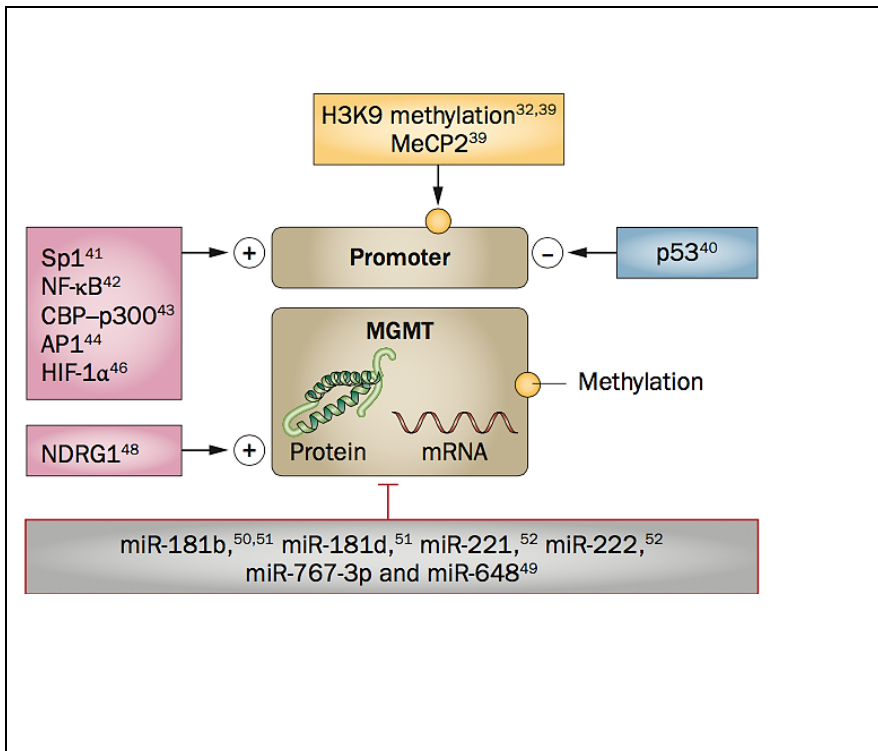
El gen MGMT se localiza en el cromosoma 10q26 y consta de 5 exones. Una isla CpG 5' que incluye 98 dinucleótidos CpG abarca gran parte de la región promotora y del 1er exón. Aunque se sabe que la metilación de la isla CpG asociada al MGMT se correlaciona con la no expresión del gen, todavía no está claro cuántos sitios CpG y cuáles en particular han de ser metilados para silenciar la transcripción del gen<sup>41</sup>.

Además de la metilación del promotor hay otros mecanismos que regulan la actividad de la proteína MGMT. La metilación del tronco del gen MGMT también parece ser funcionalmente relevante en que haya unos niveles significativamente más altos o más bajos de la proteína, probablemente porque regula la transcripción del gen mediante la modificación de citosinas del tronco del gen. En células gliales en las que no hay metilación del promotor de MGMT pero sí del tronco, se ha visto que se puede restaurar la sensibilidad a la TMZ con la desmetilación de decitabina (un fármaco hipometilante de DNA)<sup>41</sup>.

La expresión de la proteína MGMT también puede estar alterada por modificaciones en las histonas, o expresiones aberrantes o disfunciones de los activadores o represores de la transcripción. Por ejemplo, se sabe que además de la metilación de las islas CpG, la metilación de la histona H3 lisina 9 (H3K9) se asocia a la disminución de la transcripción del promotor de MGMT y sin embargo, la acetilación de esta histona está asociada con la expresión de la proteína MGMT. Por lo tanto, el aumento de la acetilación de H3K9 y la disminución de la metilación de la misma se relaciona con una regulación positiva del MGMT y con la adquisición de resistencia a la temozolomida<sup>41</sup>.

Por otro lado, hay factores de transcripción que promueven la actividad del promotor de MGMT (Sp1, NF- $\kappa$ B,...) y otros que son represores de la transcripción (p ej p53). Además, cada vez hay más evidencia de que la hipoxia regula de forma positiva la expresión de MGMT vía factor inductor de hipoxia (HIF- 1 $\alpha$ ), y que puede contribuir a la resistencia a la TMZ en los glioma stem cells localizados en los nichos perinecróticos<sup>41</sup>.

La proteína MGMT también puede ser regulada por microRNAs a nivel postranscripcional<sup>41</sup>.



**Figura 6<sup>41</sup>** | Regulación de MGMT. La expresión y regulación de MGMT está regulada vía mecanismos epigenéticos; un ejemplo de ello es la metilación del promotor—p. ej, vía H3K9 o MeCP2- o del tronco del gen. Otros mecanismos de regulación incluyen la factores de transcripción que se unen al promotor de MGMT y que inducen (+) o reducen (-) su actividad, interacciones proteína-proteína (en el caso de NDRG1), y la regulación negativa vía microRNAs. Abreviaturas: H3K9, histone H3 lisina 9; MeCP2, metil-CpG proteína de unión 2; MGMT, O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferasa.

#### 1.5.4 Implicaciones de la metilación MGMT

El valor potencial de la proteína MGMT como biomarcador de respuesta al tratamiento se demostró por primera vez en pacientes con gliomas malignos, quienes se beneficiaban del tratamiento con carmustina o TMZ de forma importante cuando los niveles de MGMT en su tumor estaban bajos<sup>30,37</sup>. Se cree que la disminución de la expresión de la proteína MGMT se debe mayormente a la silenciamiento epigenética del gen MGMT debido a la metilación del promotor. Existe correlación entre la metilación del promotor del gen MGMT y una mejora en la supervivencia en gliomas tratados con nitrosoureas o TMZ.

Diferentes estudios han demostrado el valor predictivo del estatus de metilación del promotor del gen MGMT en los pacientes con GBMs tratados con TMZ (tabla 2), siendo el más sólido de ellos el desarrollado por la EORTC y el grupo canadiense antes ya mencionado<sup>36</sup>. En este estudio, el estatus de MGMT fue uno de los 2 factores pronóstico independientes.

**Tabla 2.** Evidencia para la implicación clínica del estatus de metilación del promotor de MGMT en glioblastomas<sup>31</sup>.

Study	Treatment regimen	Participants	Progression-free survival (months) stratified by MGMT methylation status*	Overall survival (months) stratified by MGMT methylation status*	MGMT methylated: unmethylated (%)
Esteller <i>et al.</i> (2000) <sup>29</sup>	WBRT, cisplatin and carmustine	49 patients with newly diagnosed anaplastic astrocytoma or glioblastoma* aged 38–70 years	21 (methylated) vs 8 (unmethylated)	>30 (methylated) vs 21 (unmethylated)	40:60
Hegi <i>et al.</i> (2004) <sup>54</sup>	Radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide	38 patients with newly diagnosed glioblastoma and KPS >70 aged ≥18 years	Not reported	62% (methylated) vs 8% (unmethylated) at 18 months	68:32
Hegi <i>et al.</i> (2005) <sup>3</sup>	Radiotherapy (30×2 Gy) vs radiotherapy followed by temozolomide	573 patients with newly diagnosed glioblastoma and KPS >70 aged 18–70 years	5.9 vs 10.3 (methylated), 4.4 vs 5.3 (unmethylated)	15.3 vs 21.7 (methylated), 11.8 vs 12.7 (unmethylated)	45:55
Herrlinger <i>et al.</i> (2006) <sup>98</sup> Glas <i>et al.</i> (2009) <sup>99</sup>	Radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide or lomustine	31 patients with newly diagnosed glioblastoma and KPS >70 aged 18–70 years	19 (methylated) vs 6 (unmethylated)	34.3 (methylated) vs 12.5 (unmethylated)	42:58
Weller <i>et al.</i> (2009) <sup>44</sup>	Radiotherapy (n=72) vs radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide (n=229)	301 patients with newly diagnosed glioblastoma aged ≥18 years	7.1 vs 11.4 (methylated), 7.1 vs 6.9 (unmethylated); HRs for MGMT status and treatment both 0.51 (0.38–0.68)	9.9 vs 24.1 (methylated), 8.8 vs 12.9 (unmethylated); HR for MGMT status 0.39 (0.28–0.54), HR for treatment 0.51 (0.38–0.68)	44:56
Gilbert <i>et al.</i> (2013) <sup>14</sup>	Radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide (on 5 of 28 days) vs radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide (on 21 of 28 days)	833 patients with newly diagnosed glioblastoma and KPS >60 who underwent resection, aged >18 years	8.8 vs 11.7 (methylated), 7.1 vs 8.2 (unmethylated)	23.5 vs 21.9 (methylated), 16.6 vs 15.4 (unmethylated)	30:62 <sup>§</sup>

\* El estatus de metilación de MGMT se midió mediante la MSP (MSP cuantitativo a tiempo real en el caso de Gilbert *et al.*<sup>14</sup> study).  
<sup>‡</sup>Estudio de Cohorte con una intervención planificada., <sup>§</sup>8% no concluyente o zona gris de estatus de metilación. AAbreviaturas: KPS, estado general medida por la escala de Karnofsky; MGMT, O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferasa; MSP, PCR metilación específica; WBRT, radioterapia holocraneal.

Sin embargo, el valor pronóstico independientemente del tratamiento recibido está más discutido. Algunos autores afirman que su valor pronóstico depende del estado mutacional de IDH<sup>42</sup> y otros como Molenaar<sup>43</sup>, que los pacientes IDH mutados MGMT metilados viven más que los que solo son IDH mutados o MGMT metilados. En los gliomas con mutaciones en IDH1 e IDH2, el MGMT es uno de los genes que se metila debido a los cambios en la metilación de DNA que suceden a consecuencia del aumento de niveles de 2-hidroxiglutarato, que la producen de forma aberrante las enzimas IDH1 e IDH2 mutadas. La 2-hidroxiglutarato inhibe varias enzimas dependientes de α-ketoglutarato. La inhibición de estas enzimas da lugar a una metilación aberrante de DNA y de histonas que resulta en un aumento de metilación de las islas CpG de las células gliales con IDH1 e IDH2 mutados. Este fenotipo metilador (fenotipo metilador de islas CpG en gliomas o G-CIMP+) conlleva la silenciación epigenética de diferentes genes, entre ellos el MGMT<sup>42</sup>.

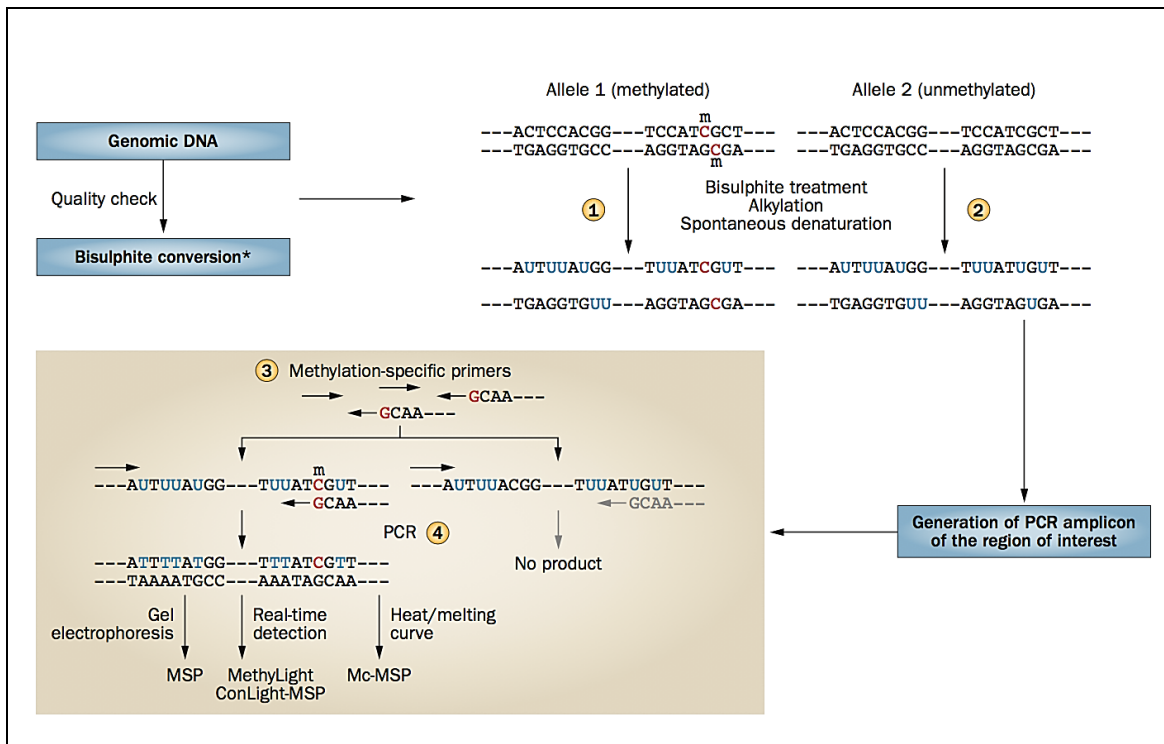
Las causas y mecanismos moleculares de la metilación del promotor de MGMT en aquellas células gliales que no tienen IDH1 o IDH2 (un 40% de los gliomas) mutados es menos conocida<sup>41</sup>. En cualquier caso, Wick demostró que, a pesar de ser IDH wild type, aquellos

tumores que tenían la metilación de MGMT respondían mejor a la quimioterapia, no así si recibían radioterapia<sup>42</sup>.

El valor predictivo de respuesta en astrocitomas anaplásicos es más discutido<sup>44,45</sup> y no se ha demostrado en los oligodendrogliomas anaplásicos<sup>46</sup>.

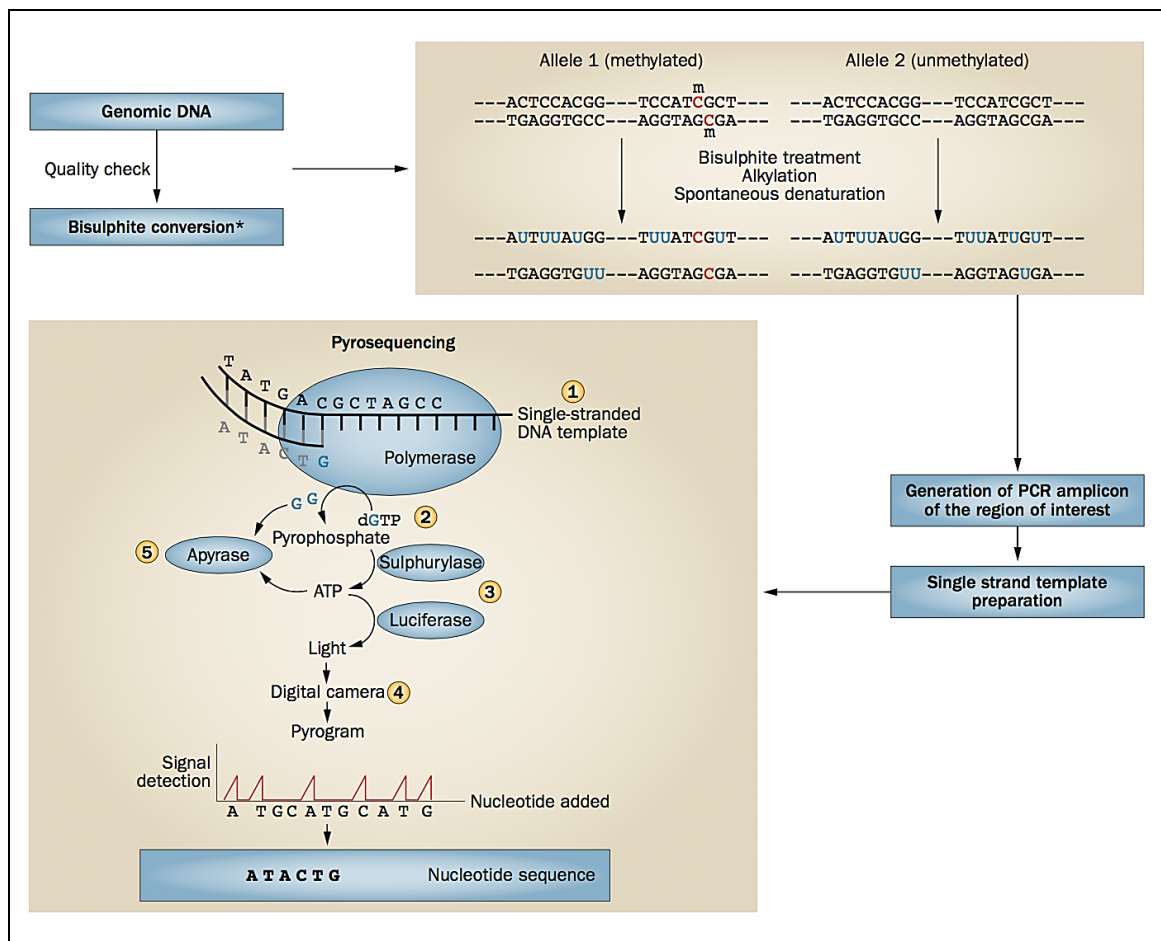
### 1.5.5 Determinación de la metilación de MGMT

El estado de MGMT se puede determinar midiendo la metilación del promotor, la expresión del RNAm del MGMT mediante la PCR “quantitative reverse transcription” (RT-PCR), la detección de la proteína por inmunohistoquímica o análisis western blot o midiendo la actividad enzimática de MGMT<sup>41</sup>.



**Figura 7<sup>41</sup> | PCR Metilación específica.** Es el método que más frecuentemente se emplea; el DNA se trata con bisulfito que convierte los residuos de citosina en uracilo, pero deja los residuos de 5-metilcitosina sin alterar (1–2). Los pares primers de metilación específica (3), incluyen secuencias complementarias a aquellos que contienen solo los 5-metilcitosinas no convertidos. Por contra, los pares primers no metilación-específica incluyen secuencias complementarias a aquellos en los que las citosinas no metiladas se han convertido a timinas. El estatus de metilación en un sitio concreto se determina según que primer específico amplifica el DNA. (4). Abreviatura: MSP, PCR metilación específica.

Desgraciadamente la técnica más sencilla, la inmunohistoquímica, tiene un valor muy controvertido. Los métodos más utilizados son la PCR- metilación específica (MSP) y la pirosecuenciación, que miden la metilación de DNA en el promotor. Determinar el estado de MGMT es complejo; no existe consenso acerca de cual es el método óptimo de análisis para determinar el estatus de metilación de MGMT y ello también ha dificultado su implementación como biomarcador<sup>47</sup>.



**Figura 8<sup>41</sup> | Pirosecuenciación.** Esta técnica se fundamenta en la detección de la liberación de pirofosfato tras la incorporación de un nucleótido en una cadena de ADN mediante una reacción de luciferasa. Así, la pirosecuenciación consiste en la extensión de un cebador sobre una cadena simple de ADN, de modo que la incorporación de cada nucleótido genera una intensidad de luz proporcional a la cantidad de nucleótidos incorporados. Dado que el tratamiento con bisulfito genera un polimorfismo C/T en los sitios CpG (C = alelos metilados; T = alelos no metilados), la pirosecuenciación permite cuantificar el porcentaje de metilación en cada sitio CpG en una región de hasta 50 pares de bases

## 1.6 GLIOBLASTOMA Y EDAD

La mediana de edad al diagnóstico de estos tumores es de 64 años; su incidencia a partir de esa edad está aumentando (de 5,3 por 100000 habitantes en la década de los setenta a 10.6 en la de los noventa)<sup>5</sup>. En un estudio australiano, la incidencia durante el periodo de 2000 a 2008, aumentó en esta población de 10,3 a 14,4 x 100000 habitantes<sup>48</sup>.

En el estudio de la EORTC que aupó al tratamiento combinado con TMZ y radioterapia tras la cirugía como tratamiento estándar<sup>10</sup>, la edad límite en la que se incluyeron pacientes era de 70 años y la proporción de pacientes entre 60 y 70 años era de un 30%; en un subanálisis realizado en este grupo, la mediana de supervivencia era similar en los pacientes que recibieron el tratamiento combinado que en los pacientes que recibieron solo radioterapia,

probablemente debido a una mayor toxicidad en el grupo de la combinación (sobre todo neurotoxicidad y toxicidad hematológica) y no debido a más tasas de progresiones en este grupo.

Los GBMs que suceden en pacientes mayores de 65 años de edad tienen un perfil molecular menos favorable. Suelen ser GBMs que debutan de novo, con una firma molecular que incluye ausencia de mutación en IDH, frecuentemente tienen la amplificación de EGFR y la delección o mutación de PTEN<sup>49</sup>. Además, hay datos que sugieren que algunas alteraciones moleculares tienen diferente efecto en la supervivencia según el rango de edad del paciente. Por ejemplo, las alteraciones en TP53 se han asociado a una menor supervivencia en pacientes mayores de 70 años al contrario que en gente joven dentro del mismo estudio. Del mismo modo, alteraciones en CDKN1A/p16 confieren peor pronóstico en pacientes > 70 años que en < 70 años. También hay estudios que han demostrado que la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR) es mayor en pacientes mayores de 55 años. Este hallazgo ha reabierto el interés por utilizar bevacizumab (anticuerpo antiVEGFR) en este grupo de pacientes<sup>5</sup>.

La metilación de MGMT, que es un factor predictivo en pacientes con GBMs en general, también lo es en pacientes mayores. Casi un 40-60 % de los pacientes mayores con GBMs tienen la MGMT metilada<sup>5</sup>. De hecho, hay autores que afirman que este porcentaje es más prevalente en este grupo de edad que en los < 70 años<sup>50,51</sup>, aunque no se puede descartar que ello se deba que en el tejido cerebral normal, a partir de los 50 años aumenta la metilación del promotor MGMT, y por tanto sea un efecto contaminante.

Hay algún trabajo publicado, uno de cuyos objetivos era correlacionar la distribución regional de la metilación de MGMT con la edad<sup>52</sup>. A ese respecto, hallaron que donde más frecuentemente hallaban metilación era en 2 loci en concreto (CpG 25 y CpG165) y que esto ocurría más frecuentemente en los pacientes más jóvenes (< 65 años). En este grupo de edad la metilación sí tenía mejor pronóstico pero porque eran G-CIMP +; sin embargo, en los > 65 años, incluso en los G-CIMP(-), la metilación del locus CpG 165 (localizado en el tronco) sí que tenía impacto pronóstico independiente (no así la metilación de CpG 25) .

Dos grandes estudios europeos en pacientes mayores con GBMs demostraron que, independientemente del tratamiento, la metilación del promotor de MGMT se asociaba con una ganancia en supervivencia global de 3 meses, de 8.2 meses en los no metilados a 11.9 en los metilados en el ensayo NOA-08<sup>39</sup> y de 6.9 meses a 9 meses en el estudio Nordic<sup>38</sup>. Además, dejaron a relucir que en pacientes candidatos a monoterapia frente al tratamiento combinado estándar con TMZ y radioterapia (esquema Stupp), aquellos que tuvieran la metilación de MGMT se beneficiaban más de la TMZ que de la radioterapia y que por el contrario, aquellos que no tenían el promotor de MGMT metilado se beneficiaban más de realizar radioterapia sola. Recientemente se han publicado los primeros resultados del ensayo de la EORTC 26062-22061 que intentaba ver si el añadir TMZ a la radioterapia hipofraccionada (consiste en la administración de menos dosis de radioterapia, pero en menos tiempo: 40 grays en 3 semanas frente a los 60 Gy en 6 semanas habituales) es mejor que hacer solo radioterapia en pacientes mayores de 65 años y si este beneficio es diferente según el estado de MGMT<sup>40</sup>. En este estudio, se ha demostrado que los pacientes que reciben el tratamiento combinado progresan más tarde y que viven más que los que solo reciben radioterapia y que este beneficio es

particularmente más evidente en pacientes con la metilación de MGMT, donde se dobla la supervivencia prácticamente (13,5 meses frente a 7,6 meses). Por todo ello, si ya parecía importante el realizar de rutina el test para la metilación de MGMT a todos los GBMs, ésta parece aún más determinante en este grupo de edad, ya que a fin de evitar mayor toxicidad, se podría seleccionar hacer monoterapia con radioterapia o TMZ en función de si tiene la metilación de MGMT o no.



## **2. HIPOTESIS DE TRABAJO**



En este trabajo partimos de la hipótesis conceptual de que la metilación del promotor de MGMT silencia la expresión de la enzima MGMT, enzima que repara el daño en el DNA de los gliomas de alto grado tratados con temozolomida (TMZ). Por tanto, su medición permitiría considerarlo como factor a tener en cuenta a la hora de establecer el tratamiento de los pacientes diagnosticados de glioma de alto grado.

Como hipótesis nula (H0) se establece que no existe asociación entre la metilación del promotor de MGMT y la respuesta al tratamiento con TMZ en pacientes con gliomas de alto grado.

Nuestra hipótesis alternativa propone que:

**H1.-** La metilación del precursor del MGMT puede ser un factor predictivo de respuesta al tratamiento con TMZ en nuestro medio.

**H2.-** Tiene un valor predictivo más potente que otros factores moleculares, clínicos o radiológicos.

**H3.-** El valor predictivo de esta metilación es independiente de la edad, comorbilidad y estado funcional y puede ayudarnos a la hora de tomar decisiones terapéuticas en pacientes mayores y/o con comorbilidad.



# **3. OBJETIVOS**



El objetivo principal de este trabajo es analizar si la metilación de MGMT tiene valor predictivo de respuesta al tratamiento con agentes alquilantes como la temozolomida (TMZ) en los pacientes afectos de glioblastoma multiforme (GBM) o gliomas de alto grado diagnosticados y tratados en nuestro centro.

Para el desarrollo del estudio, hemos desglosado el objetivo general del trabajo en los siguientes objetivos específicos:

- **Objetivo 1:** Establecer una cohorte clínica de seguimiento de pacientes con GBMs diagnosticados y tratados en nuestro centro.
  
- **Objetivo 2:** Evaluar el impacto en la supervivencia del GBM con estado de metilación del promotor del precursor de MGMT
  
- **Objetivo 3:** Determinar la asociación entre el tratamiento con TMZ y el estado de metilación del promotor del MGMT
  
- **Objetivo 4:** Correlacionar el estado de metilación del promotor del MGMT a distintos marcadores clínicos: estado general, nivel cognitivo, tipo de cirugía.
  
- **Objetivo 5:** Evaluar la asociación del estado de metilación del promotor de MGMT con grupos de edad
  
- **Objetivo 6:** Ver si el efecto de las variables analizadas varía dependiendo de la edad





# **4. MATERIAL Y METODOS**



#### 4.1.- DISEÑO

Estudio retrospectivo y observacional sobre muestras patológicas para determinar el estado de metilación del precursor de MGMT en pacientes con glioblastoma multiforme (GBM) tratados en nuestro hospital y correlacionarlo con la respuesta a temozolomida (TMZ).

#### 4.2 PERIODO DE INCLUSIÓN DE LOS PACIENTES

Desde el 15 de enero de 2003 hasta el 31 de julio de 2017.

#### 4.3.- CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

- **Criterios de inclusión:** Pacientes mayores de 16 años, diagnosticados y tratados en nuestro centro por glioma de alto grado, astrocitoma anaplásico o GBM. El diagnóstico histológico se obtuvo mediante biopsia o resección tumoral. El tratamiento recibido incluía cirugía (resección o biopsia), radioterapia y/o quimioterapia basada en TMZ ( $\pm$  2º fármaco).

- **Criterios de exclusión:**

1) Pacientes que inicialmente debutaron como glioma de bajo grado y que con la evolución se transformaron en un glioma de alto grado. La razón para excluirlos fue que intentábamos obtener un grupo de pacientes lo más homogéneo posible; en el caso de los pacientes con gliomas de bajo grado, éstos ya han recibido otros tratamientos antes de su transformación a tumores de alto grado y además, su pronóstico a priori, es diferente.

2) Pacientes menores de 16 años, dado que la historia natural de estos tumores en edad pediátrica es diferente.

#### 4.4.- RECOGIDA DE DATOS

Para la obtención de datos se recurrió a la base de datos hospitalaria de pacientes diagnosticados de gliomas de alto grado, desarrollada por el comité de neurooncología del Hospital Universitario Donostia y el Instituto Biodonostia. Los pacientes que se incluyen en dicha base de datos, previamente deben firmar un consentimiento informado para poder ser incluidos. A partir de esa base de datos, se confeccionó una nueva que contenía la información clínica y molecular necesaria para realizar el estudio estadístico que nos habíamos propuesto. Se revisaron una a una todas las historias clínicas incluidas en esta nueva base de datos.

#### 4.5 VARIABLES INCLUIDAS

Las variables recogidas en la base de datos fueron:

- 1) **Datos demográficos:** fecha de debut clínico; fecha de diagnóstico histológico; fecha de cirugía; en el caso de que hubieran recibido radioterapia y/o quimioterapia, fechas de inicio y fin de las mismas; fecha de recaída; a la recaída, en el caso de que hubieran

recibido algún tipo de tratamiento (cirugía y/o quimioterapia u otras drogas), fecha de inicio y fin; fecha de último control y fecha de éxitus si lo hubiere.

- 2) **Datos clínicos:** sexo, edad en el momento del diagnóstico\*, estado funcional medida por la escala de Karnofsky<sup>53</sup> (IK %, puntuación de 0 a 100, siendo los valores altos los que reflejan mejor estado general) y estado neurológico medida por el test de mini-mental (Mini-Mental State Examination, MMSE<sup>54</sup>: puntuación de 0 a 30, siendo los valores altos los que indicaban mejor estado cognitivo) antes y después de los tratamientos y en el momento de la recaída.

\* **Análisis de la Edad:** Para hacer el análisis en función de la edad, se tomó en cuenta la edad en el momento de la cirugía diagnóstica. Teniendo en cuenta que, a priori, la edad es un factor pronóstico de supervivencia en GBMs<sup>2,5</sup>, se establecieron 3 grupos: los  $\geq 65$  años por un lado, los menores de 50 años por otro lado y un tercer grupo de pacientes con edad comprendida entre los 50 y 64 años.

- 3) **Datos de la cirugía inicial:** si fue total/subtotal o parcial/amplia o biopsia y si hubo complicaciones postquirúrgicas. El grado de resección se midió en base a la identificación de áreas de realce de contraste en la resonancia magnética postquirúrgica (en secuencia T1) obtenida en las primeras 72 horas del postoperatorio. Se consideró que la resección era total/subtotal si el volumen de extirpación era igual o mayor del 90% ( si no se identificaban las áreas de realce de contraste en T1 o si éstas eran igual o  $< 10\%$  respecto la resonancia prequirúrgica; parcial o amplia, si era igual o mayor del 50% pero menor del 90% (realce de contraste en T1 en la RM postquirúrgica  $> 10\%$  pero  $< 50\%$  respecto a la RM prequirúrgica); biopsia, si el volumen de extirpación fue  $< 50\%$  ( realce de contraste en T1  $> 50\%$  en RM postquirúrgica)
- 4) **Datos de la radioterapia:** si la recibieron o no, dosis recibida, si recibió TMZ concomitante o no.
- 5) **Datos de la quimioterapia basada en TMZ:** si la recibieron o no\* y número de ciclos\*\*.  
\* Hubo pacientes que además de la TMZ recibieron un segundo fármaco como tratamiento inicial; este número de pacientes era muy pequeño por lo que no se estimó preciso incluirlos en un grupo aparte.  
\*\* **Número de ciclos:** Para determinar si la duración del tratamiento con TMZ podía influir en la supervivencia global (SG), se establecieron 3 grupos: los que no habían recibido TMZ en monoterapia – grupo 1 –; los que habían recibido entre 1 y 5 ciclos - grupo 2- y los que habían recibido 6 o más ciclos – grupo 3-. En el primer grupo, podía haber pacientes que solo habían recibido TMZ asociada a la radioterapia.
- 6) **Toxicidad :** toxicidad relacionada con la radioterapia, toxicidad hematológica y no hematológica achacada a la TMZ tanto durante la fase de la concomitancia como en la fase de monoterapia; la toxicidad se recogió según la escala “Common Terminology Criteria for Adverse Events”, versión 4.0<sup>55</sup>
- 7) **Datos de la recaída:** además del estado general y cognitivo, se recogió si había hecho algún tipo de tratamiento y qué tipo en concreto (cirugía, tratamiento sistémico y en este caso qué).

## 8) Datos moleculares:

### ○ **análisis de la metilación de MGMT:**

El estudio retrospectivo se diseñó para determinar la metilación del promotor del MGMT mediante la técnica de PCR específica para metilación sobre la biopsia, método diagnóstico habitualmente más empleado para realizar el análisis de la metilación. Con esta técnica, se analizaron las muestras almacenadas en el biobanco desde el año 2005 hasta otoño de 2016; El número de muestras disponibles con las que contábamos era de 94. Para poder almacenar las muestras en el biobanco, previamente los pacientes han debido firmar un consentimiento informado específico para ello.

Desde finales de 2016, la determinación del MGMT se viene llevando a cabo de forma sistemática y rutinaria en anatomía patológica sobre tejido incluido en parafina, en todos aquellos pacientes intervenidos por glioma de alto grado (biopsia o resección); para ello, se emplea la técnica de pirosecuenciación (PyroMark Q24)(Quiagen®). La pirosecuenciación se realiza en material fijado en formol e incluido en parafina y cuantifica el porcentaje de metilación en cada sitio CpG. En nuestro hospital, una vez cuantificado el porcentaje de metilación, se establecen 3 subgrupos en base a ese porcentaje de metilación: no metilado (0-8%), metilado (13-100%) y patrón de metilación moderado/bajo (9-12%)<sup>56,57</sup>.

### ○ **Análisis de p53: Mutación / No mutación del gen p53.** Se realiza de forma sistemática y rutinaria en el servicio de anatomía patológica y utilizan técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). La IHQ detecta, mediante anticuerpos monoclonales anti-p53, el acúmulo de proteína p53 anómala (normalmente mutada). La detección es posible porque al mutar el gen (p53), la proteína que produce es defectuosa y no se puede degradar, con lo que se acumula y aumenta su vida media, permitiendo su inmuno detección. Las muestras se analizan atendiendo al porcentaje de células reactivas y la intensidad de la tinción (mutado (IHQ+), no mutado (IHQ-)).

### ○ **Índice de proliferación celular Ki67:** Este índice, que mide la velocidad del crecimiento tumoral, se realiza analizando el grado de expresión del antígeno Ki67. También se realiza de forma sistemática y rutinaria en el servicio de anatomía patológica, utilizando también técnicas de IHQ. Para esta determinación se emplea el anticuerpo monoclonal antiKi67: este anticuerpo, detecta un antígeno nuclear que se expresa exclusivamente en las células que entran al ciclo celular (fases G1, S, G2 y mitosis) pero no en G0. El análisis se realiza considerando también el porcentaje de células reactivas y la intensidad de tinción y en los informe anatomo-patológicos viene reflejado como un valor numérico (en tanto por ciento)- a mayor número -> mayor proliferación-.

## 9) **Diagnóstico anatomo- patológico:** Se establecieron 2 grupos: astrocitomas anaplásicos por un lado y GBMs o gliomas de alto grado. Se aceptó el diagnóstico de glioma de alto grado cuando la toma de muestra fue solo una biopsia. Para el diagnóstico histológico, el servicio de anatomía patológica sigue los criterios basados en la clasificación WHO

(World Health Organization) – OMS (Organización Mundial de la Salud)<sup>4</sup>- específica para ello, el sistema de gradación histológica más comúnmente empleado-. En este trabajo, dado que la mayoría de la muestra era anterior al año 2016, no se han tenido en cuenta los criterios moleculares de la última actualización<sup>4</sup>.

#### **4.6.- TRATAMIENTO**

El tratamiento en los gliomas de alto grado consiste en una resección lo más amplia posible y después, tratamiento complementario con radioterapia y quimioterapia basada en TMZ ; lo estándar suele ser una primera fase con radioterapia 60 Gy en total administrados en 30 fracciones diarias durante un periodo de 6 semanas asociada a TMZ 75 mg/m<sup>2</sup>/día seguida de 1 mes de descanso y luego, una segunda fase que consiste en 6-12 ciclos de TMZ a dosis de 150-200 mg/m<sup>2</sup>/día durante 5 días seguidos cada 28 días (esquema de Stupp<sup>10</sup>). En pacientes jóvenes con necesidad de tratamiento de soporte con corticoides y a los que solo se les ha podido hacer una biopsia o resección parcial, se suele contemplar la opción de añadir bevacizumab (un anticuerpo antiangiogénico que ha demostrado actividad en gliomas de alto grado endovenoso a dosis de 10 mg/kg administrado quincenalmente) al esquema habitual de Stupp<sup>19</sup>. En ocasiones, en pacientes de más edad o pacientes frágiles, se opta por realizar o bien radioterapia, o bien solo TMZ, o bien radioterapia sola seguida de TMZ.

#### **4.7.- SEGUIMIENTO Y EVALUACION DEL PACIENTE**

Los pacientes recogidos en nuestra base de datos que fueron tratados con radioterapia y/o quimioterapia, una vez acabado el tratamiento, fueron valorados en consulta cada 3-4 meses los 2 primeros años, cada 6 meses a partir del 3er año y una vez al año a partir del 6º año; las consultas se alternaron en oncología médica y radioterápica y siempre se les pedía RM para el próximo control. Durante el tratamiento, en el caso de que recibieran TMZ-radioterapia, los controles se hacían cada 3 semanas en oncología médica, con analítica, y cada 7-10 días en radioterapia; cuando estaban solo con la TMZ, las consultas eran el día 1 de cada ciclo, siempre con analítica. La primera RM control tras la radioterapia se hizo a las 6 semanas aproximadamente de haber acabado la misma, tal y como está establecido en el protocolo y si no había incidencias, la siguiente RM antes de acabar el tratamiento, se hizo después del 5º o 6º ciclo de TMZ.

#### **4.8.- DETERMINACION DE LA PROGRESION DE ENFERMEDAD**

La progresión radiológica se definió como progresión objetiva radiológica. Para los pacientes con resección completa en la cirugía inicial, progresión de enfermedad se definió como tumor captante de contraste recurrente en la RM realizada durante el tratamiento o seguimiento. Para paciente con resto tumoral ya objetivado en la RM postquirúrgica, progresión de enfermedad se definió como crecimiento del 25% o más del área tumoral (dos diámetros perpendiculares). En los casos de sospecha inicial de pseudoprogresión (captación precoz de contraste que puede ocurrir en relación a la radioterapia y no por progresión real durante los 3-6 primeros meses después de acabar la radioterapia) que luego no se confirmaba (porque

era progresión finalmente), se tomó como fecha de progresión la fecha en la que se hizo esa RM en la que se sospechó de pseudoprogresión la 1ra vez. En aquellos casos en el que no se pudo realizar la RM craneal, se definió como progresión, la progresión sintomática y la fecha en la que se constató dicha progresión. Progresión sintomática la definimos como deterioro del estado general en ausencia de RM y que no fueran justificables por otra causa salvo la progresión tumoral. En aquellos casos perdidos en el seguimiento, en el que no había posibilidad alguna de mejoría clínica o radiológica, se tomó como fecha de progresión la fecha de éxitus.

#### **4.9.- ANALISIS ESTADISTICO**

Para estudiar la asociación de las variables clínicas con el estado de metilación se han utilizado el test de Fisher y/o Chi cuadrado para las variables cualitativas y el t-student y/o el análisis de varianza para las variables cuantitativas. Posteriormente se realizó el análisis multivariado mediante una regresión logística binaria.

La supervivencia global se midió desde la fecha de la primera intervención quirúrgica (en la que se obtuvo el diagnóstico histológico) hasta su muerte o fecha de último control o contacto. La supervivencia libre de progresión o recaída se midió desde la fecha de la primera intervención quirúrgica (en la que se obtuvo el diagnóstico histológico) hasta la progresión de enfermedad o muerte (en el caso de que no estuviera documentada la progresión) o hasta la fecha de último control. Para calcular la mediana de supervivencia así como la probabilidad de supervivencia a 12 y 24 meses se utilizó el método de Kaplan-Meier.

Se estudió la asociación de la metilación, de la edad, del tratamiento adyuvante, estado general y del tipo de cirugía con la supervivencia comparando las curvas con el test de Log-Rank. Posteriormente se realizó una regresión de Cox con las mismas variables.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas valores p iguales o menores a 0,05. El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SPSS versión 23.

#### **4.10 CONSIDERACIONES ETICAS**

Para la elaboración de este trabajo, se ha tenido en cuenta la propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos promulgada por la Asociación Médica Mundial mediante la Declaración de Helsinki<sup>58</sup>. Este trabajo cumple los requisitos en materia de protección de datos que se aplican a proyectos de investigación previstos en la normativa nacional vigente, conforme a la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos (LOPD) y su Reglamento de desarrollo aprobado por el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre<sup>59</sup>.

La base de datos hospitalaria de pacientes diagnosticados de gliomas de alto grado, desarrollada por el comité de neurooncología del Hospital Universitario Donostia y el Instituto Bionostia, de la que se obtuvieron los datos para la presente tesis, tiene la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Donostia. Los pacientes que se incluyen en dicha base de datos, previamente deben de firmar un consentimiento informado para poder ser incluidos. Tanto esta base de datos como la que se confeccionó a partir de ésta, para la elaboración de la tesis, no incluyen la identidad de los pacientes ni datos

personales, y la información obtenida se mantendrá en completa confidencialidad, siendo la única responsable del manejo de los datos recopilados la autora de la presente tesis.



# **5.RESULTADOS**



### 5.1. ESTABLECIMIENTO DE LA COHORTE DE LOS PACIENTES CON GLIOBLASTOMA

Desde el 15 de enero de 2003 hasta el 31 de julio de 2017, se recogieron en la base de datos de gliomas de nuestro hospital 355 pacientes con diagnóstico histológico de glioblastoma multiforme (GBM), glioma de alto grado o astrocitoma anaplásico mayores de 16 años. De esos 355 pacientes se excluyeron aquellos casos que inicialmente habían debutado como glioma de bajo grado (21), con el fin de obtener un grupo más homogéneo en cuanto al tratamiento recibido. El número final de pacientes analizados fue de 334.

**Tabla 3.- CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES**

<b>Edad</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
< 50	47	14,32
50-64	149	44,47
≥65	138	41,11
<b>Sexo</b>		
Mujer	139	41,8
Hombre	195	58,2
<b>IK %</b>		
>80	45	13,4
70-80	114	34
60	74	22,1
<60	75	22,4
Desconocido	26	8,1
<b>MMSE</b>		
25 o mas	59	17,6
24 o menos	14	4,2
Desconocido	261	78,14
<b>Volumen de extirpación quirúrgica</b>		
Total/subtotal	149	44,8
Parcial	84	25,4
Biopsia	100	29,9
<b>Radioterapia</b>		
Si	252	75,44
No	82	24,55
<b>Temozolomida concomitante</b>		
Si	200	59,19
No	134	39,81
<b>Temozolomida adyuvante (nºciclos)</b>		
0	119	35,4
1-5	129	38,4
≥6	86	25,8

IK: Indice Karnofsky; MMSE: mini mental state examination

En la tabla 3 se enumeran las características de estos 334 pacientes; el 58,2 % eran varones y el 41,8% mujeres; la edad media fue de 60 años. En el momento del diagnóstico, casi la mitad (47,4%) tenían un índice de Karnofsky mayor del 70% (máxima puntuación, mejor estado general). En el 8,1% de los pacientes no se determinó el índice de Karnofsky. En cuanto al estado cognitivo medido por la escala MMSE, el número de pacientes que lo tenían determinado fue de solo un 22,1% del total de los pacientes (73 pacientes) y de ellos, más del 80% (59), tenían una puntuación mayor de 25 (máxima puntuación: 30, que equivale a mejor estado cognitivo) .

En el momento del análisis, de los 334 pacientes, 290 pacientes habían fallecido (86,6%) y 283 habían recurrido (84,5%). De los 290 pacientes fallecidos, 259 lo hicieron por progresión tumoral (89,31%) y 30 pacientes (10,34%) sin haber recaído, bien por complicaciones postoperatorias en las primeras 4 semanas tras la intervención (17 pacientes (5,86%)), bien por complicaciones que surgieron durante o después de la radioterapia y/o temozolomida (13 pacientes (4,48%))(tabla 4). En los pacientes que murieron por deterioro neurológico tras la radioterapia, en todos ellos se objetivaban cambios en la sustancia blanca en probable relación a radioterapia y 1 de ellos estaba valorado como radionecrosis.

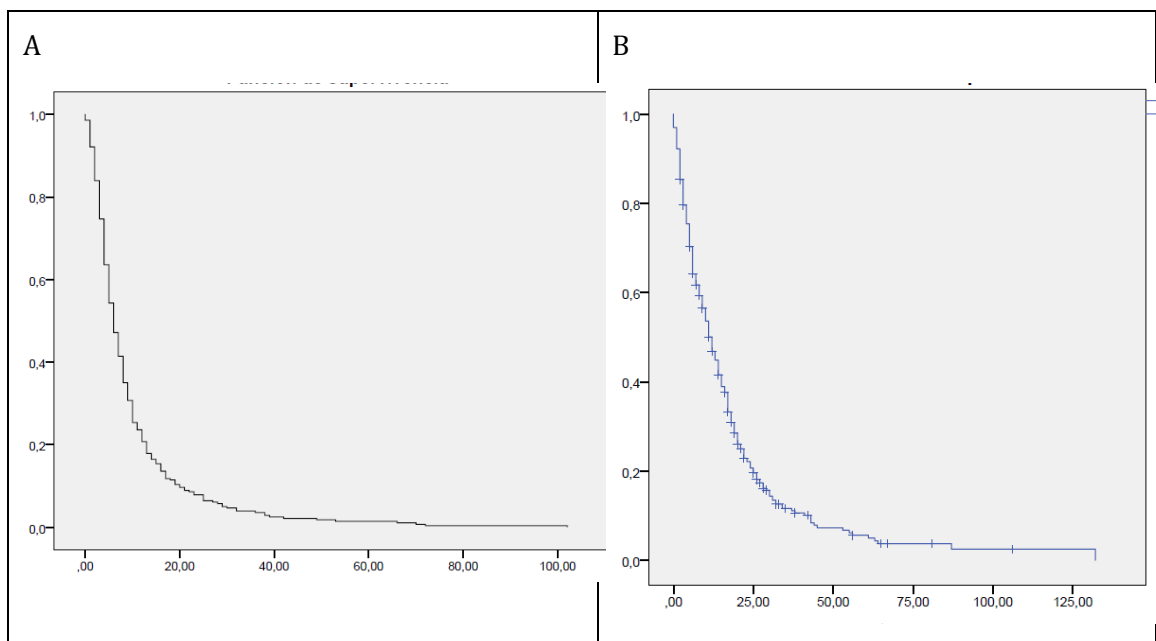
**Tabla 4.- CAUSA EXITUS EN PACIENTES SIN RECAIDA O PROGRESION**

	RESECCION COMPLETA		RESECCIÓN PARCIAL		BIOPSIA	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>(5,17)</b>	<b>10</b>	<b>(3,44)</b>	<b>5</b>	<b>(1,72)</b>
<b>COMPLICACIONES POST- IQ</b>	<b>9</b>	<b>(3,10)</b>	<b>7</b>	<b>(2,41)</b>	<b>1</b>	<b>(0,34)</b>
Edema cerebral + herniación	3	(1,03)	2	(0,68)	0	
Hemorragia Cerebral	2	(0,68)	1	(0,34)	0	
Edema cerebral + sepsis + infarto ACM	1		0		0	
Neumonía por aspiración	2	(0,68)	0		0	
Perforación de colon	1	(0,34)	0		0	
Edema + hemorragia cerebral	0		3	(1,03)	0	
Neumoencéfalo	0		1	(0,34)	0	
Hematemesis						
<b>COMPLICACIONES DURANTE/POST RT y/o TMZ</b>	<b>6</b>	<b>(2,06)</b>	<b>3</b>	<b>(1,03)</b>	<b>4</b>	<b>(14,79)</b>
Deterioro cognitivo post fin Stupp	2	(0,68)	1	(0,34)	0	
Deterioro cognitivo desde fin RT	2	(0,68)	0		0	
Deterioro neurológico durante RT-TMZ	1	(0,34)	0		0	
Sepsis + Insuficiencia respiratoria	1	(0,34)	0		0	
Neumonía por aspiración	0		1	(0,34)	0	
Neumonía por pneumocystis + pancitopenia	0		1		0	
Sepsis + pancitopenia	0		0		1	(0,34)
TEP	0		0		2	(0,68)
Crisis comicial durante RT-TMZ	0		0		1	(0,34)

IQ: Intervención quirúrgica; ACM: Arteria Cerebral Media; RT: radioterapia; TMZ: temozolomida; TEP: tromboembolismo pulmonar

## 5.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESION (SLP) Y SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG)

La mediana de SLP fue de 6 meses (IC 95% 5,20 – 6,79). La SLP a 12 y 24 meses fue del 20,7% y del 7,9% respectivamente. La mediana de la SG fue de 12 meses (IC95% 10,12 – 13,87) y la SG a 12 y 24 meses fue del 46,8% y del 20,7% respectivamente (figura 9)



**Figura 9.-** Supervivencia. **A:** Supervivencia Libre de Progresión (SLP); **B:** Supervivencia Global (SG)

### 5.3. ANALISIS DE LA METILACION MGMT

De los 334 pacientes incluidos, la determinación de MGMT se pudo hacer en 107 muestras (32,03%). De estas 107 muestras, 15 se hicieron con la técnica del pirosecuenciador (las muestras obtenidas entre septiembre de 2016 y julio de 2017), 47 eran muestras almacenadas en el Biobanco y que se analizaron mediante la técnica de PCR específica para metilación (las muestras recogidas entre enero de 2007 y agosto de 2016) y las restantes 45 muestras se analizaron también mediante la técnica de PCR específica para metilación en el servicio de anatomía patológica para otro trabajo de investigación (corresponden a muestras recogidas entre enero de 2005 y diciembre de 2006). De estas 107 pacientes en los que se pudo realizar el análisis, 52 pacientes lo tenían metilado y 55 no lo tenían metilado. Cuando revisamos el estado de metilación según la técnica y época realizada observamos las siguientes diferencias: con el pirosecuenciador, 6 muestras tenían la MGMT metilada y 7 no la tenían; con la técnica de PCR específica, de las muestras analizadas entre enero de 2007 y agosto de 2016, 28 tenían la metilación y 20 no la tenían y de las muestras analizadas entre enero de 2005 y diciembre de 2006, 20 la tenían y 25 no la tenían.

**Tabla 5.-** Método de análisis de MGMT

MGMT	EDAD	TECNICA EMPLEADA		
		PCR 1 <sup>1</sup>	PCR2 <sup>2</sup>	Pirosec
metilado	60	18	25	9
No metilado	56	28	20	6

1- PCR1 : muestras enero 2007 – agosto 2016

2- PCR2 : muestras enero 2005 – diciembre 2006

La edad media de los pacientes con la metilación era de 60 años y de los pacientes que no tenían la metilación de 56 años. Teniendo en cuenta que en la literatura, en los pacientes mayores, a priori, es más frecuente que la MGMT esté metilada<sup>50</sup>, analizamos si, en nuestra muestra existía también esa asociación entre MGMT y edad, estableciendo para ello 3 grupos de edad : < 50 años (grupo 1), 50-64 años (grupo 2) y ≥ 65 años (grupo 3) . Nuestros resultados confirmaron efectivamente que, a más edad hay más probabilidad de tener la MGMT metilada (61,1% en los ≥ 65 años, 45,8% en el grupo de edad de entre 50 y 64 años y 34,7% en los < 50 años,  $p < 0,043$ ) (tabla 6).

Cuando analizamos si en el resto de variables había diferencias con respecto a si la MGMT estaba o no estaba metilada, no hallamos diferencia alguna independientemente de que fueran mujeres u hombres, tuvieran mejor o peor estado general, hubieran recibido o no tratamiento, ni tampoco si recibieron más o menos ciclos de temozolomida. En cuanto a la asociación de la metilación de MGMT con el tipo de cirugía, en el análisis univariante objetivamos una mayor proporción de pacientes con la metilación en el grupo al que solo se le había realizado biopsia, aunque las diferencias no fueron significativas ( $p = 0.14$ ) (tabla 6). Por este motivo, al realizar el análisis multivariante lo incluimos junto a la edad.

**Tabla 6.-** Asociación de estado de metilación de MGMT con las variables estudiadas

	<b>MGMT</b>				<b>p</b>
	Metilado		No metilado		
<b>EDAD</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>	
< 50	8	(34,8)	15	(65,2)	<b>0,043</b>
50 - 64	22	(45,8)	26	(54,2)	
≥ 65	22	(61,1)	14	(38,9)	
<b>SEXO</b>					
Mujer	30	(48,4)	32	(51,6)	0,5
Hombre	22	(48,9)	23	(51,1)	
<b>ESTADO GENERAL (IK)</b>					
90-100	11	(52,4)	10	(47,6)	0,71
70-80	17	(42,5)	23	(57,5)	
60	12	(54,5)	10	(45,5)	
< 60	9	(52,9)	8	(47,1)	
<b>TIPO DE CIRUGIA</b>					
R. Total/Subtotal	29	(44,6)	36	(55,4)	0,14
R. parcial	11	(45,8)	13	(54,2)	
Biopsia	12	(66,7)	6	(33,3)	
<b>TRATAMIENTO</b>					
Sí	45	(50)	45	(50)	0,34
No	7	(41,2)	10	(58,8)	
<b>Nº CICLOS TMZ</b>					
0	11	(44)	14	(56)	0,5
1-5	22	(48,9)	23	(51,1)	
≥ 6	19	(52,8)	17	(47,2)	

IK: Indice Karnofsky; R.total: Resección total; R. Parcial: Resección parcial; Nº: número; TMZ: Temozolomida

En el análisis multivariante, aunque se objetivó una tendencia a que había más pacientes  $\geq 65$  años que tenían la MGMT metilada, estos resultados no fueron estadísticamente significativos ( $p = 0,114$ ). La edad resultó ser un factor de confusión, porque al realizar el multivariado, la cirugía perdió su significado (tabla 7).

**Tabla 7.-** Asociación de la metilación de MGMT con la edad y tipo de cirugía. Análisis multivariante

	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
<b>Edad (<math>\geq 65</math>a)</b>	0,394	0,12 - 1,24	0,114
<b>Edad (50 - 64 a)</b>	0,68	0,23 - 2,01	0,496
<b>Tipo IQ (Biopsia)</b>	0,526	0,16 - 1,66	0,275

IQ: Intervención Quirúrgica; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confianza

#### **5.4. ASOCIACION DE LAS DIFERENTES VARIABLES ANALIZADAS CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN O RECAIDA (SLP)**

##### **5.4.1. ASOCIACION DE LA METILACION DE MGMT CON LA SLP**

Cuando analizamos estos parámetros en los pacientes a los que se les pudo realizar la determinación del estado de metilación de MGMT, la supervivencia libre de progresión o recaída (SLP) en los pacientes con la metilación fue de 7 meses (IC 95% 4,83 - 9,16) y de 8 meses en los pacientes que carecían de la metilación en el promotor de MGMT (IC 95% 6,14 - 9,85) sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,77$ ). (figura 10)

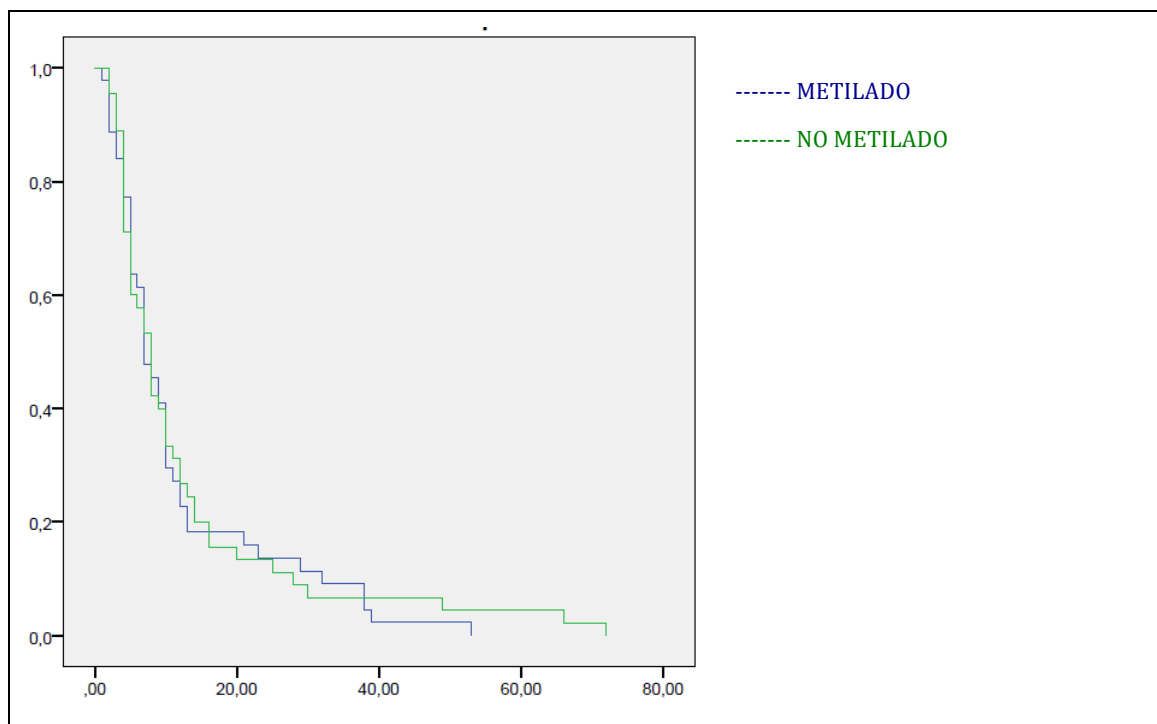


Figura 10.- SLP según metilación de MGMT

#### 5.4.2. ASOCIACION DEL TRATAMIENTO CON LA SLP

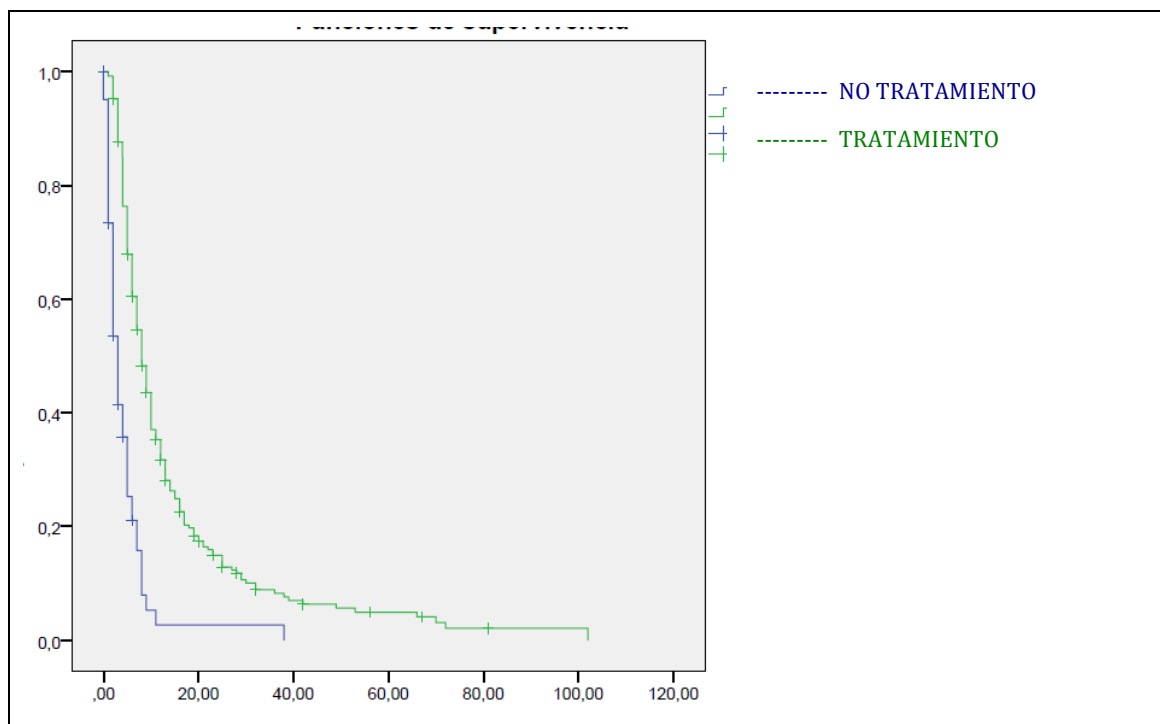
De estos 334 pacientes, 253 (75,52 %) recibieron algún tipo de tratamiento complementario (Temozolomida (TMZ) y radioterapia concomitante y/o TMZ en monoterapia), 198 (59,1%) TMZ y radioterapia concomitante y 205 (61,2%) recibieron al menos 1 ciclo de quimioterapia basada en TMZ (tabla 8). La mediana de SLP de los pacientes que al menos habían recibido algún tipo de tratamiento fue de 8 meses (IC 95% 6,88 – 9,11) frente a 3 meses (IC 95% 2,24 – 3,75) en los que no lo recibieron ( $p = 0,0005$ ). (figura 11)

Tabla 8.- Tratamiento complementario recibido

	SI	NO
TMZ-RT <sub>c</sub> y/o $\geq 1$ ciclo TMZ	253 (75,52%)	82 (24,48 %)
TMZ-RT <sub>c</sub>	198 (59,1 %)	137 (40,9 %)
$\geq 1$ ciclo TMZ	205 (61,2%)	130 (38,8 %)

TMZ: temozolomida ; RT<sub>c</sub>: Radioterapia concomitante





**Figura 11.-** Asociación del tratamiento con la SLP

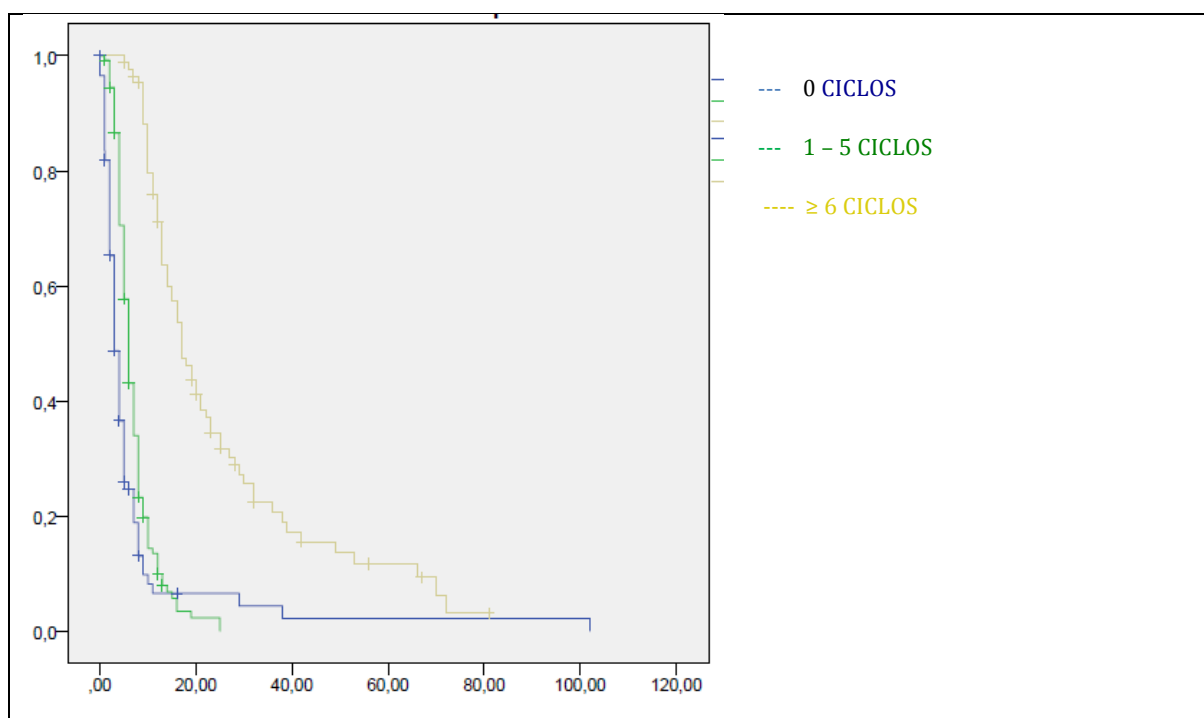
### 5.4.3. ASOCIACION DEL NUMERO DE CICLOS DE TMZ CON LA SLP

Teniendo en cuenta que más del 50% de nuestros pacientes habían recibido al menos 1 ciclo de TMZ en adyuvancia y que la SLP en todos los pacientes que habían recibido algún tipo de tratamiento fue de 8 meses, analizamos si el haber recibido TMZ durante más tiempo tuvo impacto en la supervivencia o no. Para ello, hicimos 3 grupos: los que no habían recibido TMZ en monoterapia – grupo 1 –; los que habían recibido entre 1 y 5 ciclos - grupo 2- y los que habían recibido 6 o más ciclos – grupo 3-. En el primer grupo, podía haber pacientes que solo habían recibido TMZ asociada a la radioterapia. Hubo 118 pacientes que no recibieron ningún ciclo (35, 4%), 128 recibieron entre 1 y 5 ciclos (38,4%), y 86 recibieron 6 o más ciclos (25,7%). La SLP fue de 3 meses (IC 95% 2,32 – 3,68) para los que no recibieron ningún ciclo de TMZ en monoterapia, 6 meses (IC 95% 5,40 – 6,59) para los que recibieron entre 1 y 5 ciclos y 17 meses (IC 95% 13,83 – 20,16) para los que recibieron 6 o más ciclos; estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,0005$ ), tanto para los que recibieron 6 ciclos o más con respecto a los que recibieron < 6 ciclos (1 – 5 ciclos) o no recibieron ningún ciclo como para los que recibieron algún ciclo pero menos de 6 (entre 1 – 5 ciclos) con respecto a los que no recibieron ciclo alguno (tabla 9)(figura 12).

**Tabla 9.-** Riesgo de recaída en función de número de ciclos recibidos

SLP	Ninguno vs $\geq 6$ ciclos	1 – 5 ciclos vs $\geq 6$ ciclos	ninguno vs 1 – 5 ciclos
OR (IC 95%)	5,69 (4,08 – 7,95)	3,85 (2,79 – 5,32)	1,47 (1,11 – 1,96)
Valor p	0,0005	0,0005	0,007

OR: Odds Ratio; vs: versus; IC: Intervalo de Confianza



**Figura 12.-** SLP por número de ciclos recibidos en los pacientes que recibieron  $\geq 1$  ciclos de temozolomida.

#### 5.4.4. ASOCIACION DEL ESTADO GENERAL CON LA SLP

De los 334 pacientes de la muestra obtuvimos datos de su estado general medido por la escala de Karnofsky en 308 de ellos (92,21%); en el momento del diagnóstico, el 13,4% de los pacientes tenían un índice de Karnofsky (IK) de 90 o 100 (máxima puntuación, mejor estado general), un 34% tenían un índice de 80 o 70, un 22,1% de 60 y el 22,4% restante, por debajo de 60 (tabla 3).

Cuando analizamos la SLP, objetivamos unas medianas de 20 meses para los pacientes con  $IK > 80\%$  (IC 95% 14,45 - 25,54), 9 meses (IC 95% 7,69 - 10,30) para los que tenían un IK 70-80%, 5 meses (IC 95% 3,69 - 6,30) para los que tenían un IK del 60% y 3 meses (2,23 - 3,36) para los que tenían un  $IK < 60\%$ , siendo estas diferencias estadísticamente significativas de un grupo a otro con una  $p = 0,05$  (figura 13).

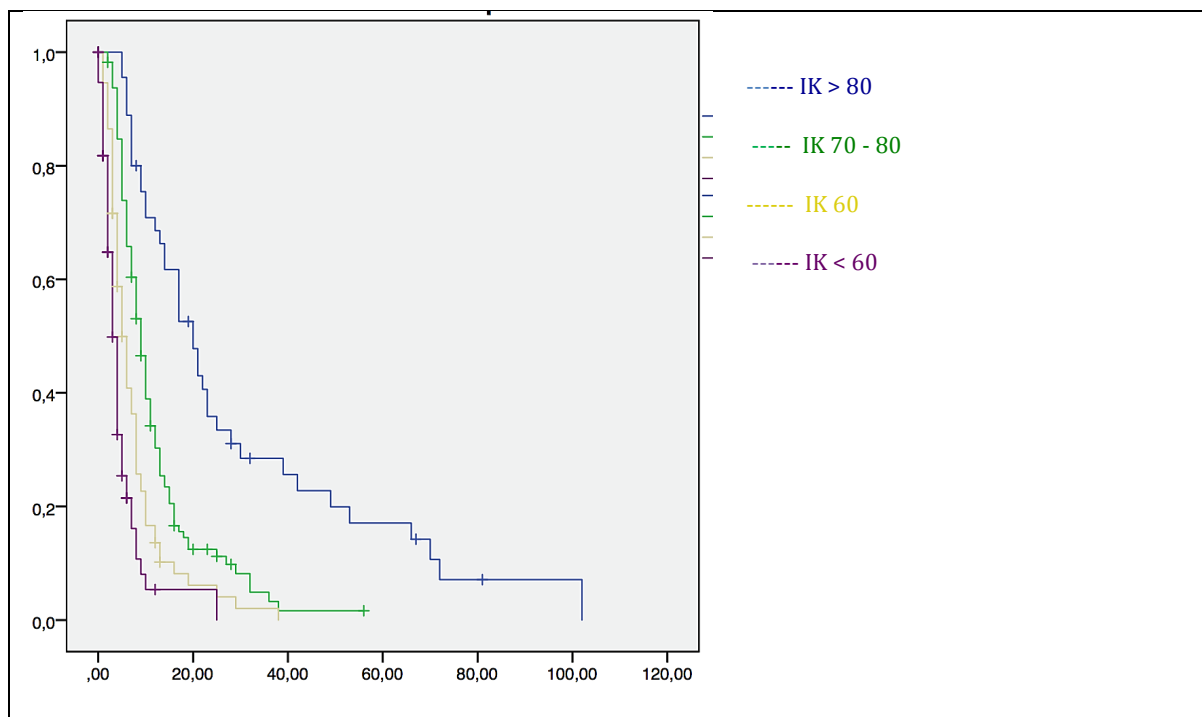


Figura 13.- SLP según estado general medido por la escala de Karnofsky (IK).

#### 5.4.5. ASOCIACION DEL TIPO DE CIRUGÍA CON LA SLP

De los 334 pacientes analizados, a 149 (44,6%) se les hizo una resección completa o subtotal, a 85 (25,4%) una resección parcial y a 100 (29,9%) pacientes sólo biopsia. La edad sí influyó en el tipo de cirugía: en el grupo de 65 o más años, solo se pudo hacer una resección completa o subtotal al 31,9% de los pacientes, mientras que en el grupo de < 50 años, se hizo en el 83,3% de los casos. En este último grupo solo se realizó una biopsia al 4,3 % de los pacientes, mientras que en los  $\geq 65$  años, se hizo en el 39,9% de los casos. En el grupo de 50-64 años, el 44,3% tuvieron una resección total o subtotal, en el 26,8% se hizo una resección parcial y en el 28,9% de los casos, solo una biopsia.

La SLP fue significativamente mejor en el grupo en el que se hizo una resección total o subtotal si lo comparábamos con los grupos en el que se hizo resección parcial o biopsia: 11 meses (IC 95% 9,28 – 12,71), 6 meses (IC 95% 4,82 – 7,17) y 4 meses (IC 95% 3,33 – 4,66) respectivamente con una  $p = 0.0005$ . La SLP a los 12 y 24 meses fue de 43,1% y 20,5% para los que tenían resección completa o subtotal, 22% y 10,3% para los que tenían resección parcial y 9,8% y 2,5% para los que tenían sólo biopsia ( $p < 0,0005$ ) (figura 14).

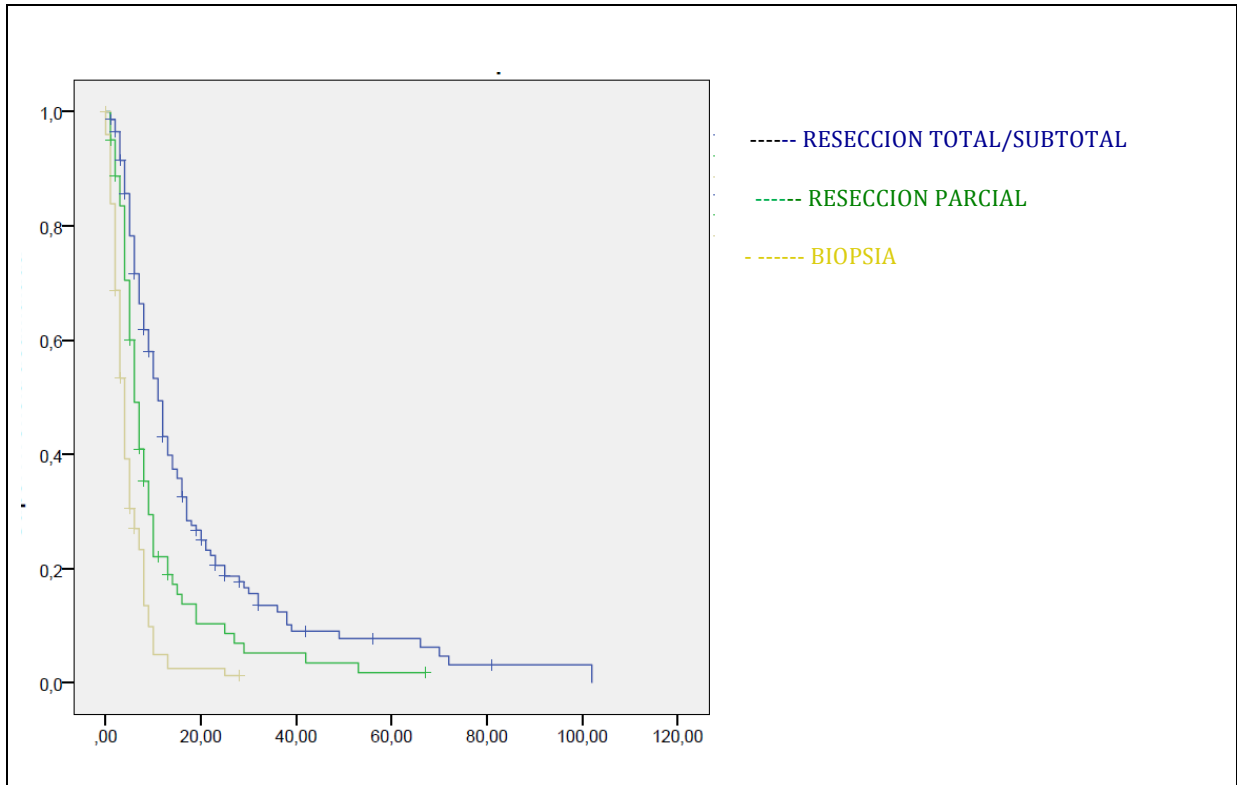


Figura 14.- SLP según tipo de cirugía.

#### 5.4.6. ASOCIACION DE LA EDAD CON LA SLP

Dado que MGMT no alteró la supervivencia en nuestra cohorte de manera total, quisimos estudiar su impacto en grupos poblacionales específicos. Teniendo en cuenta que en la literatura, la edad es un factor pronóstico independiente<sup>5</sup> y que en los pacientes mayores, a priori, es más frecuente que la MGMT esté metilada<sup>50</sup>, analizamos la supervivencia por grupos de edad, estableciendo para ello 3 grupos de edad: < 50 años (grupo 1), 50-64 años (grupo 2) y ≥ 65 años (grupo 3) – tabla 10 -.

Con respecto a la SLP estos fueron los resultados: la mediana en el grupo 1 fue de 11 meses (IC 95% 8,83 – 13,17), 7 meses en el grupo 2 (IC 95% 5,69 – 8,30) y 6 meses en el grupo 3 (IC 95% 4,98 – 7,01)(figura 15).

Tabla 10.- SLP por grupos de edad

	n	(%)	SLP
< 50 años	47	14,07	11 meses
50 - 65 años	149	44,61	7 meses
> 65 años	138	41,31	6 meses

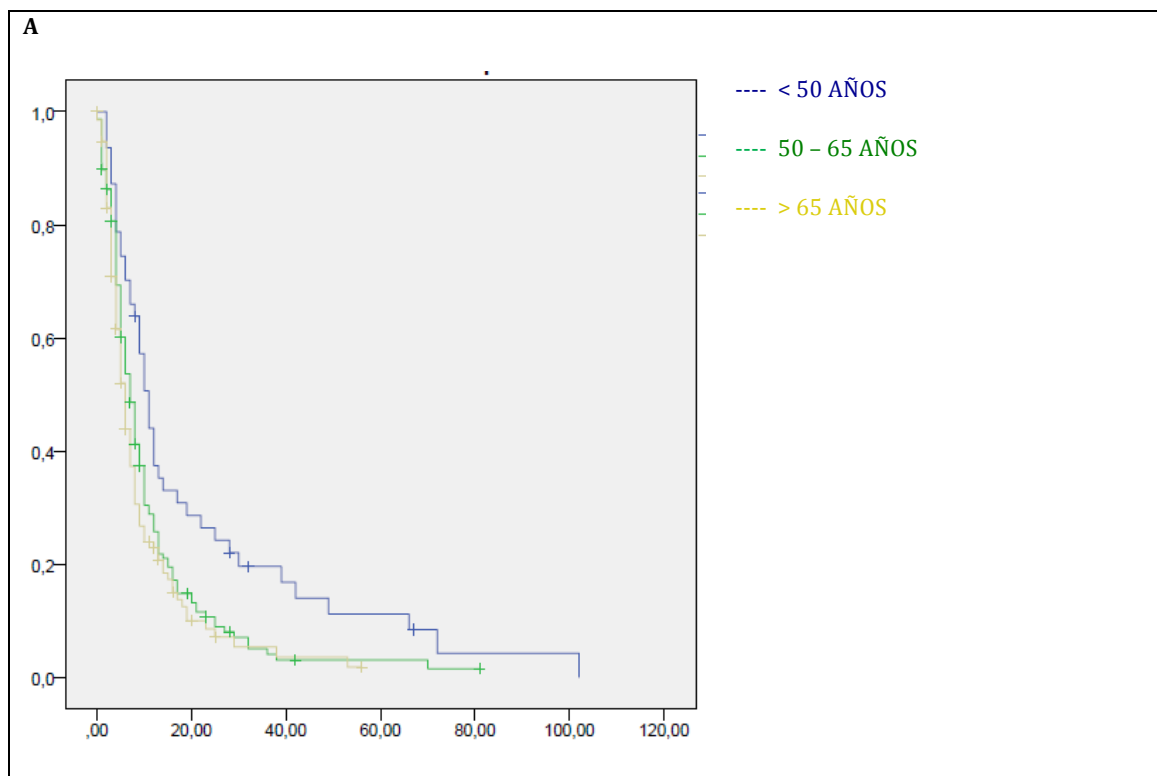


Figura 15.- SLP por grupos de edad.

#### 5.4.7. ANALISIS MULTIVARIANTE DE LA SLP

Utilizamos el modelo de regresión de Cox para realizar el análisis multivariante para la SLP e incluimos las variables que nos habían salido significativas en el análisis univariante, además de la metilación de MGMT; estas variables eran la edad, el tipo de cirugía, el número de ciclos de TMZ y el estado general medido por la escala de Karnofsky..

Al analizar el multivariante, hallamos una interacción multiplicativa entre la edad y el tipo de cirugía y el número de ciclos, con una “p” significativa. Esto indica que el efecto del número de ciclos y el tipo de cirugía sobre el tiempo a la recidiva o progresión (SLP) es diferente en función de si eres más o menos joven. Debido a ello, presentamos los resultados por separado en más jóvenes o más añosos. Por problemas de tamaño muestral, se han agrupado los resultados en < 65 años o  $\geq$  65 años.

La metilación de MGMT no demostró tener un impacto significativo en la recaída en el análisis multivariante, ni en el grupo < 65 años ni en el grupo  $\geq$  65 años.

En nuestra muestra, en los pacientes < 65 años, la cirugía no impacta de forma significativa en la recaída (dato no mostrado) en el análisis multivariante y sí se objetiva una reducción del riesgo de recaída en los pacientes que recibieron al menos 1 ciclo de TMZ; esta reducción del riesgo de recaída, se ve tanto en los que recibieron entre 1 y 5 ciclos, como en los que recibieron 6 o más, aunque la reducción del riesgo es mayor en este último grupo (OR 0,06 (IC95% 0,018 - 0,202)); en ambos casos, la reducción del riesgo fue estadísticamente significativo. Además del número de ciclos, el estado general también tuvo un impacto significativo en el riesgo de recaída independientemente del resto de factores: a peor estado general, observamos que había una tendencia a mayor

riesgo de recaída, aunque el resultado fue solo significativo en el grupo con IK < 60% (los de peor estado general), con un OR de 8,58 (IC 95% 2,206 – 33,414, p < 0,002) (Tabla 11)

Sin embargo, en los pacientes ≥ 65 años el tipo de cirugía sí demostró tener impacto en la recurrencia independientemente del resto de variables, observándose que los pacientes a los que se les había practicado una resección total o subtotal tenían un riesgo de recaída menor que a los que solo se les había hecho biopsia (OR 0,360 (IC 95% 0,097 – 1,339, p = 0,011); la resección parcial no tuvo impacto significativo (dato no mostrado). A diferencia de lo que observamos en los < 65 años, el número de ciclos no impactó de forma significativa en la recurrencia, aunque en los pacientes que recibieron por lo menos 6 ciclos sí que hallamos una tendencia a menor riesgo de recaída (OR 0,200, IC 95% 0,018 – 2,155, p = 0,184). En cuanto al estado general en el momento del diagnóstico, aunque no tuvo impacto en la recurrencia, sí objetivamos una tendencia a mayor riesgo de recaída en aquellos pacientes con peor estado general (OR 7,177 IC 95% 0,263 -196,20, p = 0,243).

**Tabla 11.-** Análisis multivariante de la recurrencia

VARIABLES		OR	IC 95%	p
< 65 años	MGMT	0,888	0,467 – 1,687	0,716
	1-5 ciclos	0,35	0,126 – 0,972	<b>0,044</b>
	≥ 6 ciclos	0,06	0,018 – 0,202	<b>0,0001</b>
	IK 70-80	1,98	0,925 – 4,247	0,078
	IK 60	2,33	0,747 – 7,285	0,145
	IK < 60	8,58	2,206 – 33,414	<b>0,002</b>
≥ 65 años	MGMT	0,360	0,097 - 1,339	0,127
	R. total/subtotal	0,182	0,049 – 0,677	<b>0,011</b>
	≥ 6 ciclos	0,200	0,018 – 2,155	0,184
	IK < 60	7,177	0,263 – 196,20	0,243

OR: Odds Ratio; IK: Indice Karnofsky; IC: Intervalo de Confianza

## 5.5. ASOCIACION DE LAS DIFERENTES VARIABLES ANALIZADAS CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG)

### 5.5.1. ASOCIACION DE LA METILACION MGMT CON LA SG

En cuanto a la SG, en los pacientes con la metilación fue de 14 meses (IC 95% 10,84 – 17,15) y en los que no lo tenían de 12 meses (IC 95% 7,58 – 16,41); esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,618$ ) (figura 16).

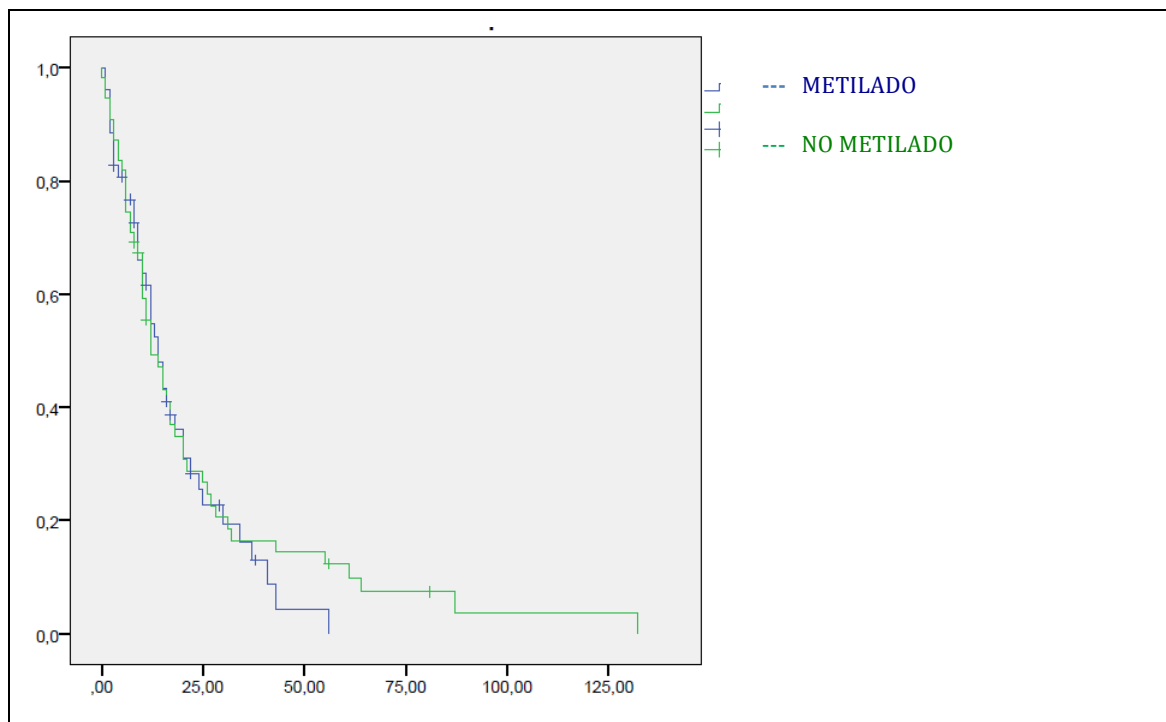


Figura 16.- SG según estado metilación MGMT.

### 5.5.2. ASOCIACION DEL TRATAMIENTO CON LA SG

La mediana de SG fue de 15 meses (IC 95% 13,30 – 16,69) frente a los 2 meses (IC 95% 1,6 – 2,4) en el caso de que no hubieran recibido ningún tipo de tratamiento ( $p = 0,0005$ ) (figura 17)

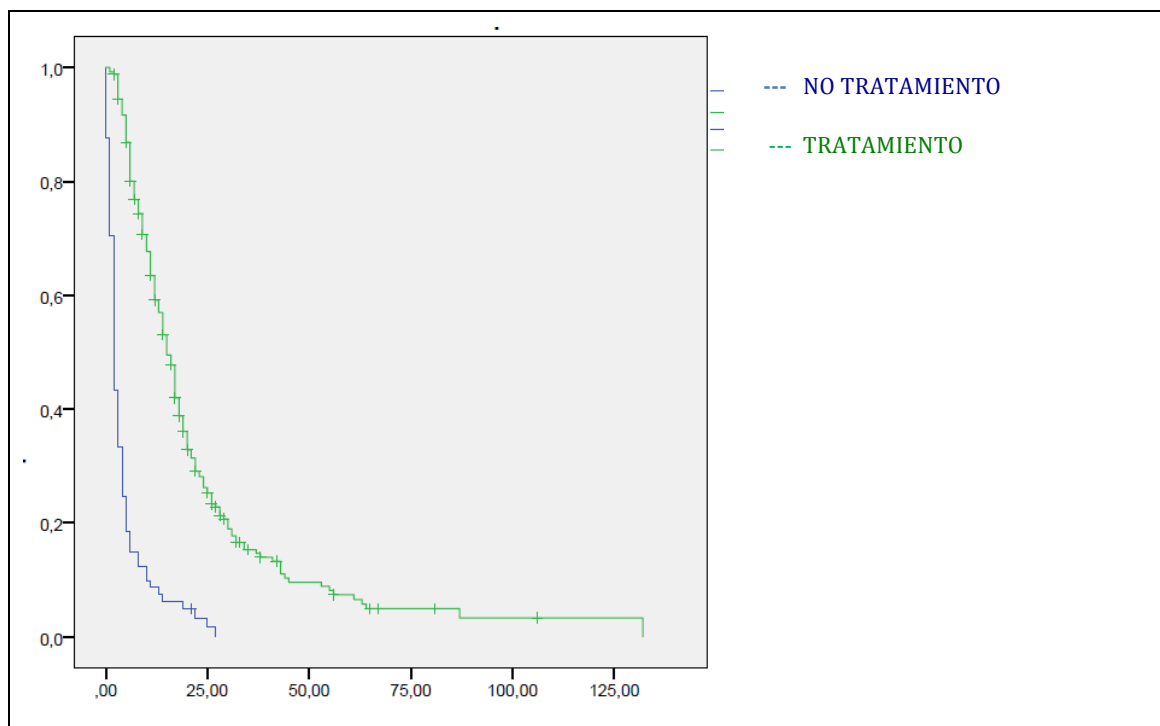


Figura 17.- SG según si recibieron tratamiento complementario o no.

### 5.5.3. ASOCIACION DEL NUMERO DE CICLOS DE TMZ CON LA SG

Al igual que con la SLP, teniendo en cuenta que más del 50% de nuestros pacientes habían recibido al menos 1 ciclo de TMZ en adyuvancia y que la SG en todos los pacientes que habían recibido algún tipo de tratamiento fue de 15 meses, analizamos si el haber recibido TMZ durante más tiempo tuvo impacto en la supervivencia o no. Para ello, establecimos los 3 mismos grupos que para la SLP (los que no habían recibido TMZ en monoterapia – grupo 1 –; los que habían recibido entre 1 y 5 ciclos - grupo 2- y los que habían recibido 6 o más ciclos – grupo 3-).

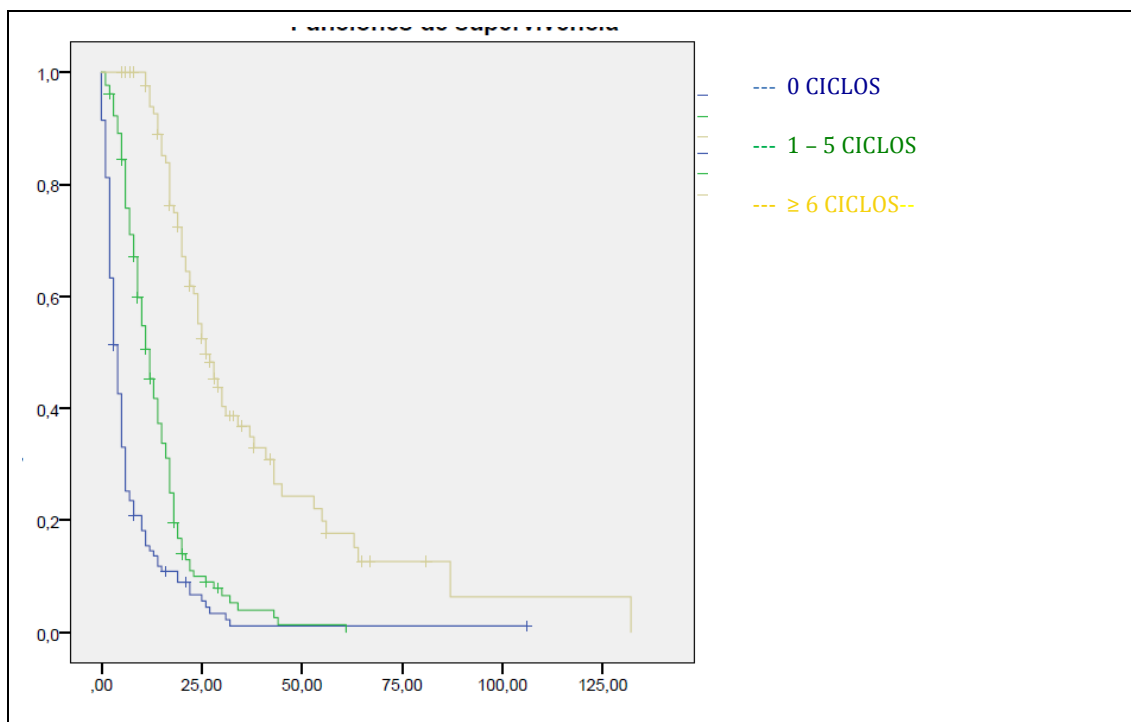
La mediana de SG fue de 4 meses (IC 95% 3,13 – 4,87) para los que no recibieron ningún ciclo de TMZ en monoterapia, 12 meses (IC 95% 10,04 – 13,95) para los que recibieron entre 1 y 5 ciclos y 26 meses (IC 95% 21,08 – 30,91) para los que recibieron 6 o más ciclos, con una  $p = 0,0005$ . (figura 18). La SG en los pacientes que recibieron 6 o más ciclos fue significativamente mejor que en los pacientes que no recibieron tratamiento adyuvante con TMZ (OR 6,51; IC 95% 4,68 – 9,06) y también mejor que en los que habían recibido entre 1 y 5 ciclos (OR 3,10; IC 95% 2,24 – 4,30). La SG de los pacientes que recibieron entre 1 y 5 ciclos también fue significativamente mejor que los que no recibieron TMZ en adyuvancia (OR 2,09; IC 95% 1,61 – 2,73) (tabla 12, figura 18).

Tabla 12.- Riesgo de muerte en función de número de ciclos recibidos

	Ninguno vs $\geq 6$ ciclos	1 – 5 ciclos vs $\geq 6$ ciclos	ninguno vs 1 – 5 ciclos
SG			
OR	6,51 (4,68 – 9,06)	3,10 (2,24 – 4,30)	2,09 (1,61 – 2,73)
Valor p	0,0005	0,0005	0,0005

OR: Odds Ratio; vs: versus



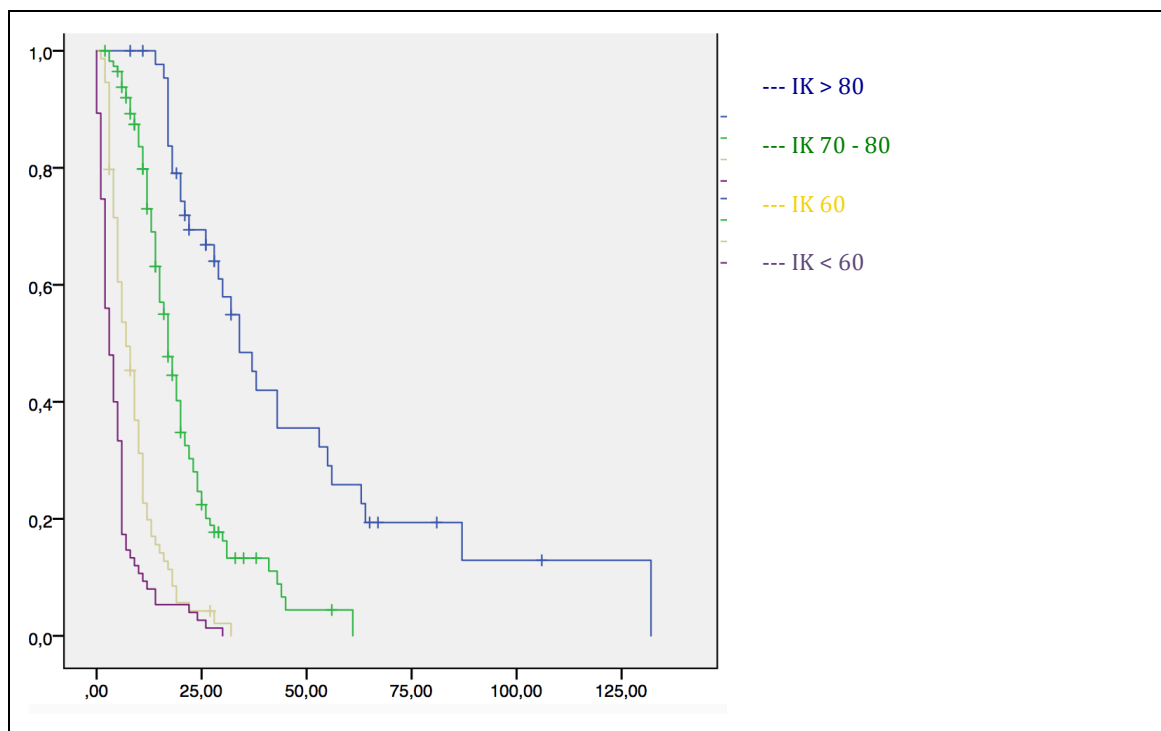


**Figura 18.-** SG por número de ciclos recibidos en los pacientes que recibieron  $\geq 1$  ciclos de temozolomida.

#### 5.5.4. ASOCIACION DEL ESTADO GENERAL CON LA SG

Como ya hemos mencionado antes, pudimos obtener datos del estado general de los pacientes en el 92,21%. Para realizar esta medición empleamos la escala de Karnofsky; la distribución de los pacientes según esta escala viene descrita en la tabla 3.

Al igual que con la SLP, las diferencias en SG de un grupo a otro también fueron todas significativas con una  $p < 0.05$ , siendo la mejor supervivencia para los que tenían mejor estado general, IK  $>80\%$ , con una mediana de 34 meses (IC 95% 25,83 – 42,16); la SG fue de 17 meses (IC 95% 14,65 – 19,34) en los que tenían un IK de 70-80%, 7 meses (IC 95% 5,05 – 8,94) en el grupo de los pacientes con IK 60% y de 3 meses (IC 95% 1,58 – 4,41 ) en los que tenían un IK  $< 60\%$  (figura 19).

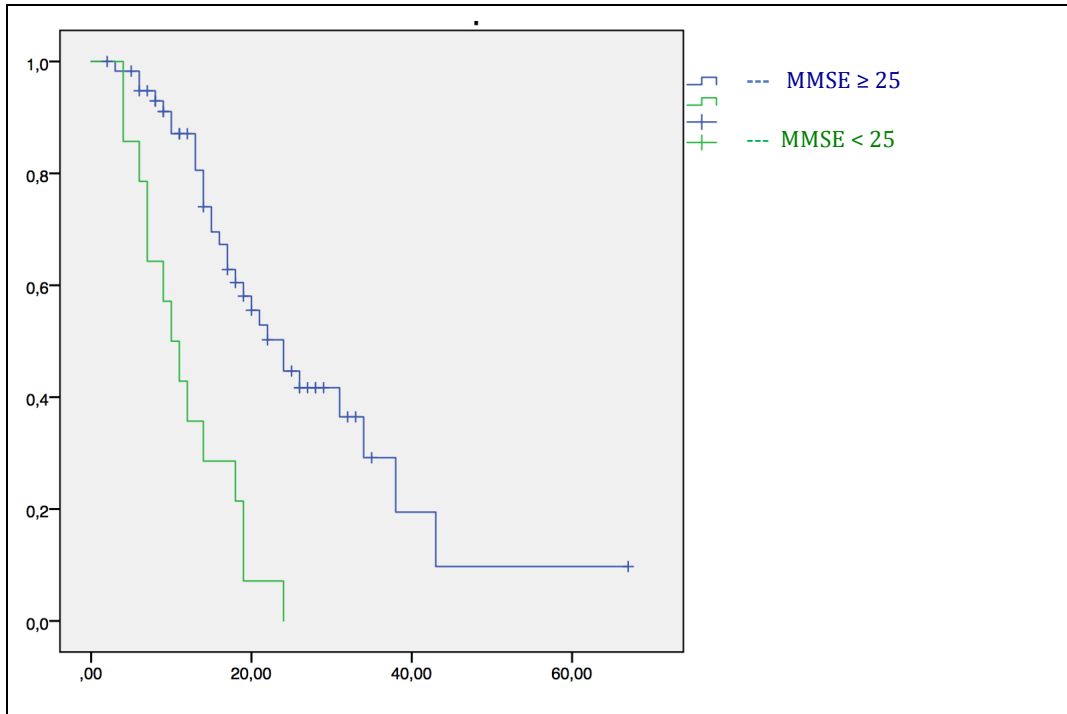


**Figura 19.-** SG según estado general medido por la escala de Karnofsky (IK).

### 5.5.5. ASOCIACION DEL NIVEL COGNITIVO CON LA SG

El nivel cognitivo medido por la escala de Mini Mental se empezó a realizar a partir del año 2012; además, tampoco todos los pacientes diagnosticados a partir del año 2012 lo tenían determinado por lo que el total de los pacientes que sí lo tenían realizado fue de un 22,1% (73 pacientes). El 80,82% de los pacientes (59), tenían una puntuación igual o mayor de 25 (máxima puntuación: 30, que equivale a mejor estado cognitivo) y el 19,17% (14), por debajo de esa cifra).

Entre los que lo tenían determinado, los pacientes cuyo nivel cognitivo medido por la escala MMSE era igual o mayor de los 25 puntos tenían una supervivencia significativamente mejor que los que tenían menos de 25 puntos (24 meses (IC 95% 18,49 – 29,54) frente 10 m (IC 95% 1,87 – 6,339))(figura 20). No revisamos su asociación con la SLP.



**Figura 20.-** SG según nivel cognitivo medido por MMSE

De los 73 pacientes que tenían determinado el estado cognitivo, solo 16 tenían analizada la metilación de MGMT por lo que no se procedió a analizar su asociación con MGMT.

### 5.5.6. ASOCIACION DEL TIPO DE CIRUGÍA CON LA SG

La SG fue significativamente mejor en los grupos en los que se había hecho al menos una resección parcial: 17 meses (IC 95% 14,88-19,11) en los que se había hecho resección total o subtotal, 11m (IC 95% 8,5 -13,49) en los que se había hecho una resección parcial y 5 meses (IC 95% 4,0 - 5,09) en los que solo se hizo biopsia ( $p= 0,0005..$ ). La SG a 12 y 24 meses fue de 65,9% y 33,8% para la resección completa/subtotal, 46,8% y 14,7% para la resección parcial y 17,6% y 4,9% para los que tenían biopsia (figura 21).

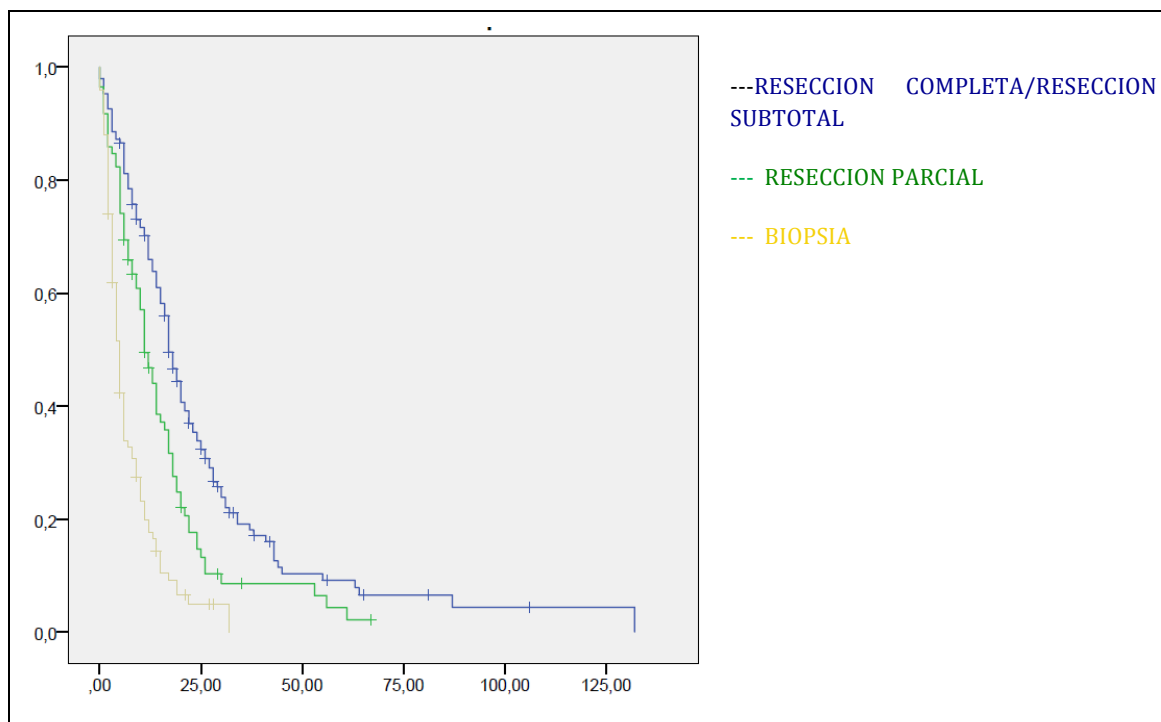


Figura 21 .- SG según tipo de cirugía

### 5.5.7. ASOCIACION DE LA EDAD CON LA SG

Al igual que cuando analizamos la SLP, por los mismos motivos, definimos 3 grupos de edad (los mismos que para la SLP) y establecimos su relación con la SG. La mediana fue de 19 meses para el grupo 1 (IC 95% 14,13-23,86), 14 meses para el grupo 2 (IC 95% 11,61-16,38) y de 6 meses para el grupo 3 (IC 95% 3,50-8,49), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,0005$ ) (figura 22). La SG a 12 y 24 m fue del 67,7% y 38,8% respectivamente para el grupo 1, 52,4% y 25,3% para el grupo 2 y de 33,6% y 9,7% para el grupo 3. A 5 años, el 14,8% (2 pacientes) de los pacientes están vivos en el grupo 1, 5% (1 paciente) en el grupo 2 y no hay pacientes vivos en el grupo 3 (figura 22, tabla 13 ).

Tabla 13 .- Supervivencia por grupos de edad

	n	(%)	SG
< 50 años	47	14,07	19 meses
50 - 65 años	149	44,61	14 meses
> 65 años	138	41,31	6 meses

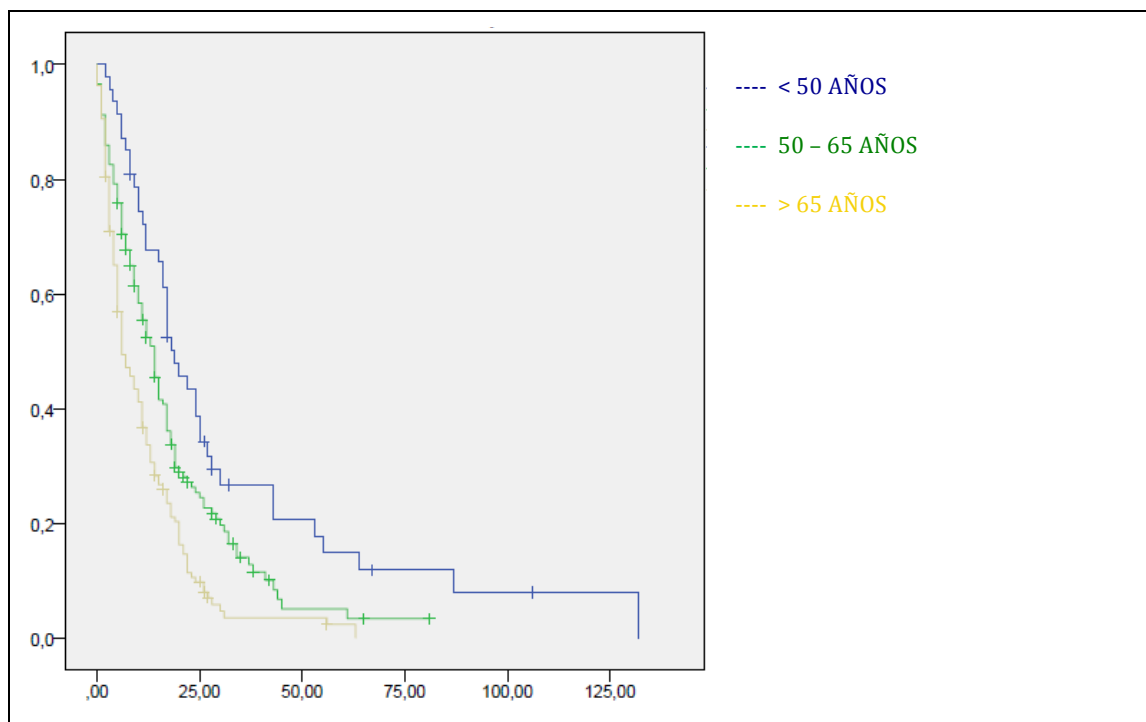


Figura 22.- Supervivencia por grupos de edad

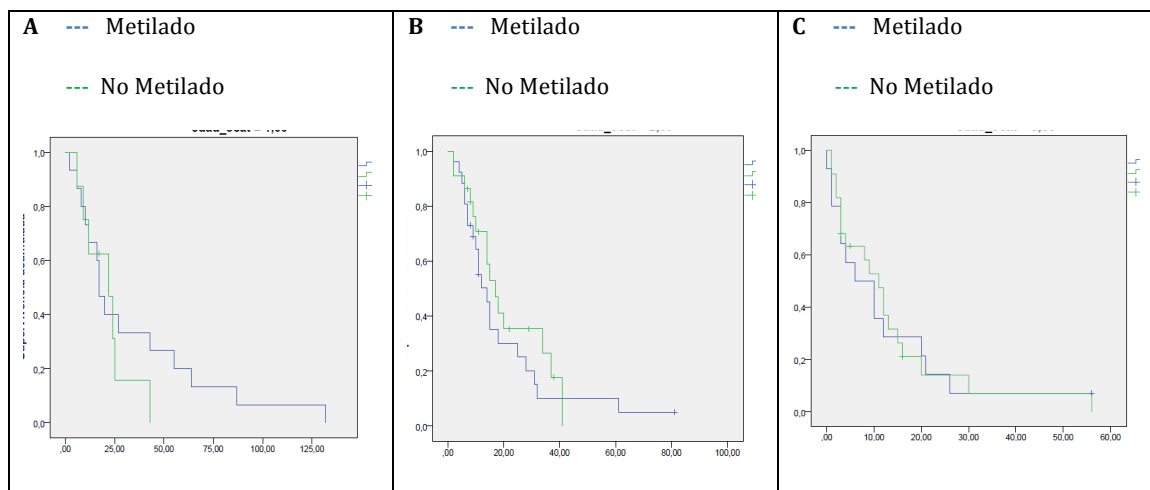
### 5.5.8. ASOCIACION DE LA EDAD CON LA METILACION DE MGMT Y CON LA SG

Revisamos también si el estado de metilación de MGMT podía influir en la SG en función de si los pacientes eran más añosos o no y estos fueron los resultados: en el grupo 1, 17 meses en los no metilados frente a 22 meses en los metilados; en el grupo 2, 14 meses en los no metilados frente a 17 meses en los metilados y en el grupo 3, de 6 meses (no metilados) versus 11 meses (metilados); Ninguna de estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p= 0,49$  grupo 1,  $p= 0,39$  grupo 2,  $p=0,98$  grupo 3) (figura 23, tabla 14).

Tabla 14.- Determinación de MGMT por grupos de edad

	Determinación realizada		Metilación		SG (meses)	
	n	(%)	Si n (%)	No n (%)	Metil +	Metil -
< 50 años	23	21,5	8 34,78	15 65,21	22	17
50 - 65 años	48	44,9	22 45,83	26 54,16	17	14
> 65 años	36	33,6	22 61,11	14 38,88	11	6

Metil: Metilación



**Figura 23.-** Supervivencia global por grupos de edad según metilación de MGMT. **A:** < 50 años; **B:** 50 – 65 años; **C:** > 65 años

### 5.5.9. ANALISIS MULTIVARIANTE DE LA SG

Utilizamos el modelo de regresión de Cox para realizar el análisis multivariante para la SG e incluimos las variables que nos habían salido significativas en el análisis univariante, además de la metilación MGMT; estas variables eran la edad, el tipo de cirugía, el número de ciclos de TMZ y el estado general medido por la escala de Karnofsky. No se incluyó el estado cognitivo medido por la escala MMSE, debido al escaso número de pacientes que tenían analizado el MMSE y determinado el MGMT.

Al analizar el multivariante, a diferencia de los que ocurrió con la SLP, no hallamos ninguna interacción multiplicativa entre las diferentes variables, por lo que no hemos tenido que analizar los resultados por separado.

En este análisis, la metilación de MGMT tampoco demostró tener un impacto significativo en la supervivencia, a diferencia de lo que observamos con el tipo de cirugía, el número de ciclos y el estado general. En cuanto al tipo de cirugía, se observó que el riesgo de muerte era menor a mayor grado de resección, aunque los resultados solo fueron significativos en el grupo a los que se les había practicado una resección total o subtotal (OR 0,329, IC 95% 0,140 – 0,771 p 0,011). En lo que respecta al número de ciclos, observamos que a mayor número de ciclos el efecto protector de éste era mayor (el riesgo de mortalidad menor) de forma significativa. Sin embargo, el estado general impacto de forma negativa en la supervivencia, pues hallamos que, a peor estado general al diagnóstico, el riesgo de mortalidad era mayor; las diferencias fueron significativas en todos los grupos establecidos y el riesgo de mortalidad fue similar para los pacientes con IK igual o menor de 60 (tabla 15).

**Tabla 15.-** Análisis multivariante de la supervivencia

VARIABLES	OR	IC 95%	p
<b>MGMT</b>	0,861	0,528 - 1,406	0,551
<b>R. parcial</b>	0,641	0,310 - 1,328	0,231
<b>R. total/subtotal</b>	0,329	0,140 - 0,771	<b>0,011</b>
<b>1-5 ciclos</b>	0,484	0,245 - 0,956	<b>0,037</b>
<b>≥6 ciclos</b>	0,163	0,071 - 0,337	<b>0,0001</b>
<b>IK 70 - 80</b>	2,602	1,276 - 5,307	<b>0,009</b>
<b>IK 60</b>	6,626	2,817 - 16,528	<b>0,0001</b>
<b>IK &lt; 60</b>	6,961	2,783 - 17,411	<b>0,0001</b>

R.parcial: Resección parcial; R. Total: resección total; IK: Índice Karnofsky; IC: Intervalo de Confianza; OR: Odds Ratio





# **6.DISCUSION**



## 6.1. SUPERVIVENCIA DE LA COHORTE Y TRATAMIENTO

La supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) obtenida en nuestra muestra (12 y 6 meses respectivamente) es más baja que la publicada en diferentes ensayos clínicos<sup>10,19</sup>, pero en estos ensayos no se incluyen pacientes que no reciben tratamiento alguno y su performance status suele ser mejor; nuestros resultados se asemejan más a la realidad diaria de cada centro, pues incluye pacientes a los que no se les ha hecho tratamiento alguno (81 pacientes, un 24% del total) por su mal estado general, porque han tenido complicaciones postquirúrgicas, pacientes a los que en algunos casos únicamente se les ha hecho biopsia, etc.. Si analizamos estos resultados en la población que sí ha recibido algún tipo de tratamiento postoperatorio (bien sea temozolomida (TMZ)-radioterapia concomitante bien sea TMZ en monoterapia o ambos dos), vemos que en ese contexto, la SG y la SLP (15 y 8 meses respectivamente) sí se parecen a lo publicado en los ensayos mencionados en la cohorte de los pacientes que reciben tratamiento (SG y SLP de 14,6 y 6,8 meses respectivamente en la era pre bevacizumab<sup>10</sup> y 16,8 y 8,4 meses respectivamente en la era bevacizumab<sup>19</sup>) y queda demostrado que el realizar tratamiento impacta de forma positiva y significativa en la evolución del paciente en cuanto a supervivencia se refiere (SG de 15 meses versus 2 meses y SLP 8 meses vs 3 meses). Bien es verdad que, los pacientes que no recibieron tratamiento no fue porque estando bien decidieron no realizarlo o algo aleatorio, sino porque en general, no estaban en situación de recibir tratamiento, pero aun siendo así, resultó ser un factor pronóstico independiente.

Los gliomas de alto grado recurren en > 90% de los casos en los primeros 5 años<sup>1,2,10</sup>. En nuestra serie de casos, entre los pacientes que fallecieron, hasta un 10,82% (30 pacientes) lo hicieron por complicaciones postquirúrgicas o durante o tras fin del tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia, todos ellos sin haber recaído o progresado. De ellos, 16 murieron en el postoperatorio inmediato (un 20% de los no tratados después de la cirugía, un 4,7% del total), lo cual puede suponer un sesgo a la hora de analizar la SLP, que en el caso de los no tratados, se superpone a la SG, ya que de haber sobrevivido al postoperatorio, casi todos ellos, habrían recaído antes o después.

Por otro lado, de los 67 pacientes (20% del total) que tuvieron complicaciones postoperatorias pero no fallecieron, casi la mitad (31 pacientes, el 38,2% de los pacientes no tratados) no pudieron recibir tratamiento complementario después; estos pacientes se perdieron en el seguimiento bien por alta a su domicilio con tratamiento sintomático paliativo o trasladados a otro centro de cuidados paliativos y no tenemos constancia del momento de la progresión por lo que se registró como fecha de progresión la fecha de éxitus.

En nuestra serie de casos, además, demostramos que los pacientes que recibieron TMZ durante más tiempo tenían mejor pronóstico que los que recibían menos (SG 26 meses, 12 meses y 4 meses para los que recibieron  $\geq 6$  ciclos,  $< 6$  ciclos y ningún ciclo respectivamente). El riesgo de fallecimiento en los pacientes que no recibieron ciclo alguno de TMZ o recibieron  $< 6$  era más de 6 veces y 3 veces mayor respectivamente que para los que recibieron  $\geq 6$  ciclos (Tabla 12) e incluso los que recibieron algún ciclo tenían un riesgo ligeramente menor que los que no recibieron TMZ (OR 2,09, tabla 12; dato no analizado en el análisis multivariante). En la literatura hay diversos trabajos publicados en la que se analiza si el dar más ciclos de TMZ tiene impacto en la supervivencia; la mayoría

de ellos han investigado si es mejor dar 6 o 12 ciclos, aunque hay algún estudio que también ha revisado el impacto de no dar, dar < 6 ciclos, 6 ciclos o > 6 ciclos; en todos ellos, los resultados son favorables a dar más ciclos, lo que concuerda con los resultados que hemos obtenido<sup>60-64</sup>.

Al igual que en otras series publicadas<sup>6,7,10,19</sup>, los pacientes a los que solo se les hizo biopsia también vivieron menos que los que se les hizo algún tipo de resección (5 meses versus 11 y 17 meses los que tuvieron una resección parcial o subtotal/total), aunque al realizar el análisis multivariante, solo la resección total o subtotal tuvo impacto significativo como factor pronóstico (tabla 15), un hallazgo que también está publicado en otras series<sup>6,7</sup>.

Con respecto a la edad en el momento del diagnóstico, si bien, los jóvenes viven más<sup>65</sup>, tienen mejor estado general, se les hace más resecciones que a los mayores, tiene menos complicaciones postquirúrgicas que ellos y llegan a recibir en mayor número el tratamiento postoperatorio<sup>12</sup>. De hecho, en nuestra cohorte, la edad no resultó ser un factor pronóstico independiente tras el análisis multivariante. Creemos que una posible explicación a este dato es que aquellos pacientes >65 años que llegan a recibir el tratamiento completo, una vez que se tratan, están en las mismas circunstancias que el resto de pacientes.

En nuestra cohorte se ha objetivado que el nivel cognitivo está asociado a la supervivencia dado que en los pacientes en los que se pudo determinar, aquellos que mejor estaban, vivieron más de forma significativa. Esta asociación ya se ha demostrado también en publicaciones recientes<sup>19,20,66</sup>.

La supervivencia también fue significativamente peor en los pacientes que tenían peor estado general; este hallazgo puede ser consecuencia de que al estar peor tienen acceso a menos resecciones, tienen más complicaciones postquirúrgicas, no llegan a recibir tratamiento complementario tras la cirugía y si la reciben tienen más complicaciones. Es un dato que tenemos que analizarlo más detenidamente y que lo deberíamos de tener en cuenta a la hora de seleccionar el mejor tratamiento posible (bien sea cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, bien sea únicamente tratamiento sintomático) para cada paciente en el momento del diagnóstico.

Cuando analizamos la SLP nos encontramos con que la edad interaccionaba con el tipo de cirugía y el tratamiento expresado en “número de ciclos recibidos”. En los pacientes < 65 años, objetivamos que el tipo de cirugía no tenía valor predictivo y sin embargo, el número de ciclos sí, cuantos más ciclos recibidos, la probabilidad de que la recaída fuese más tardía era mayor. Por contra, en los pacientes ≥ 65 años, era la resección total o subtotal la que tenía valor predictivo y el número de ciclos dejaba de serlo. Estas diferencias pueden deberse por un lado, a que en los pacientes < 65 años, más pacientes pudieron recibir al menos 1 ciclo de quimioterapia (69, 36% frente a 57,14% en los ≥ 65 años) y más del doble recibieron al menos 6 ciclos (33,16% frente a 15,94% en los ≥ 65 años); por otro lado, en el grupo de ≥ 65 años, el 31,9 % de los pacientes tuvieron una resección completa, pero solo el 15,94% completaron al menos 6 ciclos de quimioterapia, prácticamente la mitad, y sin embargo, en los < 65 años la diferencia fue bastante menor (55,1% de resecciones completas y 33,16% de al menos 6 ciclos de quimioterapia). Revisamos las características de las 2 poblaciones y si el hecho de que en el grupo de ≥ 65 años, más pacientes fallecieron sin haber recaído por complicaciones postquirúrgicas o del tratamiento con RT

y/o QT (22 pacientes – 73,33% de los 30 que estaban en esta situación-) y no creemos que nuestros resultados hayan sido influidos por este hecho: el 13,83% de los pacientes de  $\geq 65$  años que tuvieron una resección completa fallecieron por complicaciones postquirúrgicas (frente al 2,85% de los  $< 65$  años que lo hicieron por este motivo), pero es que, entre los pacientes que fallecieron sin recaer por complicaciones durante o después del tratamiento con RT y/o TMZ, en el grupo de  $\geq 65$  años, 13,63 % de los pacientes fallecieron tras haber recibido el tratamiento completo (3 pacientes de 22 frente a 2 de 65 (3,07%) en el grupo de  $< 65$  años) (tabla 4).

## **6.2. IMPACTO DE LA METILACION DEL PROMOTOR MGMT EN LA COHORTE DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DONOSTIA**

En nuestra población de pacientes con glioblastomas multiformes (GBM), astrocitomas anaplásicos y gliomas de alto grado, la metilación de MGMT no ha demostrado ser un factor pronóstico ni predictivo de respuesta a TMZ a diferencia de lo que se ha publicado en las revisiones y estudios más importantes con series de pacientes más largas<sup>36,39</sup>. Los pacientes que tenían la metilación no vivieron más que los que no lo tenían independientemente de si recibieron o no tratamiento después de la cirugía (figura 16) y tampoco respondieron mejor a la TMZ (tabla 6). En la revisión que se ha hecho de la literatura publicada, sí hemos hallado artículos en los que la metilación de MGMT no es factor pronóstico<sup>67,68</sup> e incluso, un meta-análisis a cerca del significado clínico de la metilación de MGMT recientemente publicado<sup>68</sup>, que incluye varios estudios en los que no se ha utilizado TMZ, y que concluye señalando que no se puede establecer categóricamente que la metilación de MGMT es un factor predictivo de respuesta en aquellos pacientes que han recibido un tratamiento que no contiene TMZ, pero hasta la fecha, es el primer estudio que conocemos en el que la metilación de MGMT no ha resultado ser un factor predictivo de respuesta a la TMZ. Este resultado se ha podido deber a diferentes motivos.

El estado de metilación del promotor de MGMT se determinó en 107 pacientes; aunque suponen solo un tercio de los pacientes (32,03%), creemos que es un número lo suficientemente importante como para extraer conclusiones. En el estudio de la EORTC que analizó este dato, solo se pudo realizar la determinación en el 36% de los pacientes<sup>36</sup>. En otros estudios y ensayos clínicos más recientes, la metilación de MGMT ha sido testado en mayor número de casos (56 – 75%)<sup>38,39,40</sup>. El subgrupo de 107 pacientes en las que se hizo la determinación eran representativa del resto de la muestra recogida con respecto a características generales, factores pronóstico y resultados obtenidos; sin embargo, la proporción de pacientes con solo biopsia diagnóstica (y no resección tumoral) fue más pequeña en el subgrupo en el que se testó la metilación de MGMT que en el grupo en el que no se pudo determinar (14,9% vs 36,12%). No tenemos recogido en cuántos de los pacientes con solo biopsia y que no se determinó la metilación de MGMT la muestra fue insuficiente y si ello pudo influir en el tamaño de la muestra obtenida: Se sabe que los sitios de metilación que afectan a la expresión del gen MGMT no están distribuidos de forma uniforme en la isla CpG; esta heterogeneidad tumoral hace que la expresión de MGMT y el estatus de metilación del promotor puedan depender del sitio en el que se ha recogido la muestra quirúrgica y si ésta es pequeña (p. ejemplo una biopsia) la probabilidad de que se trate de un falso negativo es mayor<sup>69</sup>.

Por otro lado, la realización de la determinación de la metilación de MGMT no ha sido homogénea a lo largo del tiempo por diferentes razones; no sabemos si este hecho ha podido influir en nuestros resultados pero creemos que ha podido ser una limitación.

La selección y manipulación adecuada de la muestra a testar es vital por parte del patólogo, no ya solo en las biopsias diagnósticas, también en las resecciones. Si hay células no tumorales contaminantes, marcar el área tumoral para que a la hora de la disección lo incluyas, proveer una estimación de células tumorales alrededor de la zona de extracción del DNA, evitar zonas de necrosis al corte que complican el análisis del bloque de biopsia, etc..

El porcentaje de metilación en los casos en los que se pudo determinarlo fue de un 48,59%, discretamente más elevada a la publicada en las series más importantes<sup>36,38-40,70</sup>. La técnica para determinar el estado de metilación de MGMT varió según la época en la que se analizó este dato, pero ambas técnicas (PCR específica para metilación y la pirosecuenciación sobre tejido de parafina) están avaladas para realizarlo; la detección de la metilación del promotor de MGMT mediante la PCR-metilación específica (MSP) es la técnica que mejores resultados ha dado en lo que respecta a correlación clínica. Es una técnica simple y costo-efectiva. Se puede realizar en pequeñas biopsias esteroatácticas, algo relativamente habitual en pacientes con GBMs irresecables. Sin embargo, no detecta patrones heterogéneos de metilación, sobre todo si el DNA extraído es de baja calidad<sup>41</sup>. Una manera de revertir esta desventaja es hacer un análisis cuantitativo de la metilación utilizando la pirosecuenciación. Con esta técnica detectamos el porcentaje de alelos metilados, que se calcula como el valor medio del porcentaje de metilación obtenido en cada uno de los dinucleótidos CpG investigados<sup>50</sup>. La pirosecuenciación evalúa sitios CpG dentro del promotor MGMT diferentes de los que mide la MSP y por tanto, si los patrones de metilación son heterogéneos puede haber discrepancias en cuanto a los resultados de uno y otro. En ese sentido, el grupo de Reifemberg<sup>50</sup> investigó la concordancia de ambas técnicas y, utilizando como punto de corte en la pirosecuenciación de < 8% versus ≥8% de alelos metilados, la discrepancia fue baja y el análisis MSP demostró no ser inferior a la pirosecuenciación para la práctica clínica habitual.

La pirosecuenciación tiene la desventaja de que es cara y no está claro cual sería el punto de corte establecido por encima del cual se consideraría una muestra metilada<sup>41</sup>. En nuestro hospital, según la bibliografía revisada por el servicio de anatomía patológica<sup>56,57</sup> se recomienda la clasificación del status de metilación del gen MGMT mediante pirosecuenciación en material fijado en formol e incluido en parafina en tres subgrupos: no metilado (0-8%), metilado (13-100%) y patrón de metilación moderado/bajo (9-12%). Para nuestro análisis consideramos como metilado el tener un patrón de metilación moderado/bajo; de los 15 pacientes que se analizaron por esta técnica, solo 2 obtuvieron ese resultado, aunque pudo influir en el alto porcentaje de metilación obtenido por esta técnica (un 60%). Hay otros grupos de trabajo, sin embargo, que establecen otro punto de corte y que han encontrado correlación del grado de metilación con la respuesta:

Reifemberg<sup>50</sup>, por ejemplo, observó que, si bien parece que hay beneficio con la quimioterapia (nitrosoureas y TMZ) independientemente de que la metilación del promotor MGMT sea débil o parcial, aquellos tumores que tenían > 25% alelos metilados tenían mejor pronóstico. Otro grupo italiano, en un análisis retrospectivo de los pacientes con GBMs tratados con radioterapia y TMZ en el área de Roma entre 2010 y 2014, establecieron tres grupos de pacientes según el estado de metilación: No metilados (0 - 9%), baja metilación (10 - 29%) y metilados (30 - 100%). En sus resultados observaron que establecer como punto de corte un 9% llevaba a una sobreestimación de los respondedores, ya que los pacientes con metilación baja-moderada recaían todos antes de los 18 meses y los que tenían un grado de metilación > 30% vivían significativamente más que el resto (25.2 meses versus 15.2 meses)<sup>71</sup>.

En cualquier caso, volviendo a nuestra muestra, siendo el número de casos analizados por esta última técnica muy baja (14%) con respecto al MSP, creo que no se puede concluir por ello, que el análisis ha de hacerse de otra manera. Tampoco podemos afirmar por este mismo motivo, que la sensibilidad de la técnica es diferente y que ello ha podido influir en los resultados. Necesitaríamos hacer una nueva revisión más adelante con mayor número de muestras testadas para poder hacer tal afirmación.

Por otro lado, de la misma manera que todavía no está claro si tiene importancia el hecho de que el gen esté metilado con más o menos intensidad, tampoco se sabe cuántos sitios CpG y cuáles en particular han de ser metilados para silenciar la transcripción del gen. Tanto Reifemberg<sup>50</sup> como este grupo italiano<sup>71</sup>, en los trabajos que acabo de mencionar, si bien observaron una gran variabilidad en el perfil de metilación, no observaron ninguna correlación entre un sitio u otro CpG metilado y recurrencia o muerte.

Con la PCR específica el porcentaje de metilación en el subgrupo de pacientes analizado por PCR fue de un 47,25%.

Por lo tanto, la técnica de elección para la detección de la metilación del promotor de MGMT es una cuestión no resuelta todavía a día de hoy.

### **6.3. RELACION DEL IMPACTO DE LA METILACION DEL PROMOTOR DEL MGMT CON LA EDAD EN LA COHORTE DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DONOSTIA**

Observamos que la metilación de MGMT es más frecuente a más edad ( media no metilados = 56 a, media metilados: 60 a; porcentaje de metilación: > 60% en los  $\geq$  65, 45% en los pacientes entre 50 y 64 años y 34,8% en los < 50 años). Este hallazgo está en concordancia con estudios publicados en otras cohortes<sup>50</sup>. Cuando analizamos la SG en base a la metilación, por grupos de edad, constatamos que en todos los grupos de edad había una tendencia a mejor supervivencia en los pacientes metilados, siendo esta diferencia proporcionalmente mayor en los pacientes  $\geq$  65 años (11 m vs 6 m), pero estos resultados no alcanzaron la significación estadística necesaria (figura 23). Hay varios estudios publicados en los que se analiza la correlación de la metilación de MGMT con la supervivencia en la población > 65 años<sup>38-40,50</sup>. En todos ellos, los pacientes con la metilación tratados con TMZ vivieron más significativamente que los no metilados (En el

ensayo de Perry<sup>40</sup>, que comparaba radioterapia con radioterapia + TMZ, los pacientes que tenían la metilación en el grupo que recibían TMZ tenían una SG de 13,5m frente a 10m en los que no tenían la metilación. El grupo de Malmstrom<sup>38</sup> que comparaba TMZ con radioterapia en los > 60 años, en el grupo que recibió la TMZ, los que estaban metilados tuvieron una SG de 9,7m frente a 6,8 meses los que no tenían el MGMT metilado. El grupo de Wick<sup>39</sup> comparaba TMZ con radioterapia en los pacientes > 65 años diagnosticados de astrocitoma o GBM y entre los pacientes tratados con TMZ, los que tenían el MGMT metilado tenían una SLP de 8,4 m frente a los 3,3m de los no metilados; en la SG también había una tendencia a favor de los metilados, pero la diferencia no fue significativa. El grupo alemán<sup>50</sup>, publicó un estudio prospectivo de cohorte en pacientes > 70 años con GBM que se trataron con RT + quimioterapia o quimioterapia o radioterapia; en este estudio, la SG fue mejor en los 2 primeros grupos si tenían la metilación que si no lo tenían (13 meses vs 10 meses en el grupo de la combinación y 7.2 m vs 2,2 m en el grupo de solo TMZ).

El porcentaje de metilación en la población  $\geq 65$  años en la mayoría de las series publicadas es menor que en el nuestro (35%-46% frente a un 65,5% )<sup>38-40</sup> y parece, que dentro de esta población, el porcentaje de metilación en los > 70 a es mayor que en los < 70 años<sup>50,72</sup>. Que el porcentaje de metilación en  $\geq 65$  años en nuestra muestra haya sido mayor (proporcionalmente más que en la población global), ha podido influir en los resultados finales, aunque ya el grupo de Reifemberg en su serie de pacientes > 70 años diagnosticados de GBM, detectó un 57% de muestras MGMT metiladas (48% metilados, 9% metilación débil).

#### **6.4. RELACION DEL IMPACTO DE LA METILACION DEL PROMOTOR DEL MGMT CON OTROS FACTORES GENETICOS EN LA COHORTE DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DONOSTIA**

Los pacientes con GBM que más se benefician de TMZ son aquellos que no tienen MGMT<sup>68</sup>; el mecanismo principal más conocido para que la proteína MGMT esté ausente en los GBMs es la metilación de su promotor, que como ya hemos mencionado, está bastante establecido en la literatura que se correlaciona con mejor supervivencia si se tratan con este fármaco; sin embargo, en nuestra cohorte, la metilación del promotor de MGMT no afecta a la supervivencia mediada por la TMZ. Esto abre puertas a posibles nuevas justificaciones como valorar el impacto de la genética. Una hipótesis podría ser que el efecto de la metilación del promotor de MGMT a la hora de que los niveles de MGMT sea bajos quede anulado por otros efectos que desconocemos, o que a pesar de que los niveles de MGMT sean bajos porque efectivamente la metilación del promotor silencia su expresión, haya otros mecanismos que desconocemos, que anulen la influencia que tiene el bajo nivel de MGMT para que el DNA tumoral no se repare bien. Por ejemplo, se sabe que la silenciación epigenética de MGMT puede tener un efecto inductor tumoral<sup>41</sup> y este hecho también podría explicar el que no hubiera diferencias en nuestra cohorte. La metilación del promotor de MGMT y la silenciación de la transcripción, además de disminuir la resistencia a la TMZ aumenta la inestabilidad genética, que puede promover la tumorigénesis, sobre todo facilitando la aparición de mutaciones en las transiciones G>A. Esto se ha visto en un experimento con ratones tratados con sustancias DNA-



alquilantes, en el que aquellos ratones con déficit de MGMT eran más proclives a desarrollar cáncer que aquellos que no tenían déficit de MGMT. Esta asociación de mutación del promotor con aumento de mutaciones en las transiciones G>A se ha visto también en genes supresores y en genes reparadores de DNA. Por lo tanto, la inactivación epigenética de MGMT puede inducir mutaciones puntuales en TP53 y otros genes supresores o reparadores tanto en la tumorigénesis como en la progresión; el tratamiento con TMZ de estos tumores puede facilitar la aparición de resistencias secundarias a agentes alquilantes induciendo mutaciones inactivadoras en los genes reparadores de DNA y creando un fenotipo hipermutador<sup>41</sup>.

Otra posibilidad que explicaría los resultados obtenidos es que la regulación de la metilación de MGMT sea diferente en nuestra cohorte. En el estudio de Hegi <sup>36</sup>, el 13,8% de los pacientes no metilados tratados con TMZ vivieron al menos 2 años. Esta observación sugiere que el test de metilación puede que no sea lo suficientemente sensible para detectar a todos los respondedores y/o que hay otros mecanismos independientes de la metilación que también reprimen a la MGMT. Por ejemplo, la transcripción y expresión posterior de la proteína MGMT puede verse afectada por factores genéticos tales como los polimorfismos de nucleótido único (SNP en inglés) en la región promotora del gen. Los estudios de “Genome-wide association” (GWAS) han identificado algunos SNPs que aumentan el riesgo para desarrollar GBMs<sup>68,73</sup>. Entre éstos, el SNP rs16906252 en el promotor de MGMT, parece tener un papel determinante en la adquisición de la metilación de MGMT y por tanto aumenta el riesgo de padecer GBMs MGMT metilados<sup>68,73</sup>; pero es que además, se ha publicado que los portadores del alelo T de esta SNP tratados con TMZ tienen mejor supervivencia independientemente del estado de metilación de MGMT<sup>73</sup>. Este resultado se ha observado en una cohorte americana y otra australiana, por lo que pudiera ser posible que este SNP u otro, también se hallara en nuestra población y podría justificar que los resultados fueran similares en la población metiladora y no metiladora. Además de los SNPs, está descrito el papel de los microRNA en la regulación post-trascripcional de MGMT<sup>41,68,74</sup>. Parece que la unión directa de microRNA específicos al extremo 3’ de transcritos de MGMT podría reducir la estabilidad del RNAm. Por ejemplo, el nivel de expresión de miR-181d se ha correlacionado inversamente con el nivel de MGMT transcrito en GBMs y además, niveles altos de miR-181d (y por tanto, niveles bajos de MGMT) se ha asociado con mejor supervivencia en pacientes con GBM tratados con TMZ<sup>74</sup>. Por tanto, la expresión aberrante de estos miRNA puede explicar en parte la expresión variable de MGMT que se observa en los tumores MGMT no metilados<sup>41</sup> y que la TMZ también funcione en la población no metiladora. Si en nuestra cohorte de pacientes con GBM hubiera niveles altos de éste u otro microRNA no identificado, podría ser otro motivo que explicara los resultados obtenidos .

## **6.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones que se han de reconocer. En primer lugar, se trata de un estudio fundamentalmente retrospectivo, lo que puede haber influido en la calidad de los datos recogidos. Por otro lado, casi la mitad de los pacientes que tuvieron complicaciones postquirúrgicas, no recibieron tratamiento posterior, y algunos se perdieron en el seguimiento por alta a su domicilio o a otro centro con tratamiento

sintomático; en estos pacientes perdidos para el seguimiento, no tuvimos constancia de la fecha de progresión, por lo que les adjudicamos como tal la fecha de éxitus, con el sesgo que ello puede conllevar.

En cuanto al tamaño muestral, la determinación de MGMT solo se pudo realizar en un tercio de los pacientes (32, 03%) y de estos, la mayoría eran resecciones cuando menos parciales; no tenemos recogido en cuántos de los pacientes con solo biopsia y que no se determinó el estado de MGMT la muestra fue insuficiente, y si ello pudo influir en el tamaño muestral. Además, la realización de la determinación de MGMT no ha sido homogénea a lo largo del tiempo por diferentes razones (ha habido periodos en los que no se ha realizado determinación alguna), lo cual ha influido claramente en el menor tamaño muestral y por otro lado, aunque el subgrupo de 107 pacientes en los que se hizo la determinación era representativo del resto de la muestra, no sabemos con seguridad si el hecho de que durante un tiempo no se realizara ha podido influir en los resultados.

Dado que el porcentaje de pacientes metilados en nuestra serie es mayor que la de otras series publicadas, desconocemos si la técnica para determinar la metilación de MGMT ha podido suponer una limitación por diferentes motivos. Por un lado, el tipo de técnica varió según la época en la que se analizó; aunque ambas técnicas, la metilación específica y la pirosecuenciación, están validadas y parece haber poca discrepancia de una a otra, no sabemos hasta qué punto ha podido suponer un pequeño sesgo; en cualquier caso, casi todas las muestras fueron analizadas mediante la metilación específica en 2 épocas diferentes, la primera antes del 2005 en el servicio de anatomía patológica y la segunda, después del 2005, y en ambos periodos los resultados en cuanto a no ser factor pronóstico ni predictivo coinciden. Otra limitación en cuanto a la técnica puede tener que ver con el punto de corte que elegimos para considerar una muestra metilada en los pacientes que se hizo la pirosecuenciación, teniendo en cuenta que en algunas publicaciones sugieren que establecer como punto de corte un 9% de alelos metilados puede llevar a una sobreestimación de los pacientes potencialmente respondedores.

Finalmente, puede haber factores que desconocemos que pueden estar afectando al resultado (por ejemplo, un perfil de metilación diferente, otras alteraciones moleculares que pueden estar interactuando,...).

En resumen, nuestros resultados no han conseguido demostrar el valor pronóstico y/o predictivo de la metilación de MGMT en los pacientes tratados en nuestro centro, ni en la población general ni en el grupo de edad de  $\geq 65$  años, aunque en este subgrupo sí que parece haber una tendencia a mejores resultados con TMZ en los pacientes metilados. Estos resultados dificultan la implementación de la determinación de la metilación de MGMT como marcador predictivo de respuesta en los pacientes diagnosticados de GBM en nuestro centro.

## **6.6 LINEAS DE FUTURO**

No hemos hallado en la literatura ningún otro estudio en el que la metilación de MGMT no ha resultado ser un factor predictivo de respuesta a la TMZ. Por ello, en la línea de la investigación realizada para esta tesis, creemos importante confirmar nuestros resultados, más teniendo en cuenta que, según la revisión que hemos hecho, no hemos hallado

publicación alguna con resultados similares. Para ello, teniendo en cuenta que, ahora, la determinación de MGMT se hace de forma sistemática en nuestro hospital y que para ello, se ha optado por la técnica de pirosecuenciación, planteamos realizar un estudio fundamentalmente prospectivo siendo más selectivos en el punto de corte de determinar cuándo una muestra está metilada. Si este nuevo análisis vuelve a descartar la asociación entre la metilación de MGMT y la respuesta a TMZ, podríamos estar ante una población genéticamente diferente o con un patrón de metilación diferente al resto; en ese caso, plantearíamos analizar cuáles son estas variantes genéticas o de metilación y estudiarlas por si pudieran resultar en nuevas dianas terapéuticas.



# **7. CONCLUSIONES**



- 1) En nuestra cohorte de pacientes diagnosticados de glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico o glioma de alto grado, la edad media al diagnóstico fue de 60 años y la incidencia fue mayor en los varones. La supervivencia en la población global fue de 1 año.
- 2) La determinación de MGMT se pudo hacer en un tercio de los pacientes; casi la mitad de éstos tenían el MGMT metilado. La edad de los pacientes con la metilación fue algo mayor en los pacientes con la metilación. No hubo diferencias en cuanto al sexo.
- 3) En el número de casos en el que se pudo realizar la determinación del estado de MGMT, el hecho de que éste estuviera metilado no influyó en la supervivencia global y tampoco en la supervivencia libre de progresión o recidiva.
- 4) Al analizar el tiempo a la recurrencia o progresión, dependiendo de la edad al diagnóstico, el efecto de las variables estudiadas fue diferente. En los pacientes más jóvenes, los pacientes tratados con TMZ en monoterapia recayeron más tarde y los resultados con 6 o más ciclos de TMZ fueron significativamente mejores que con < 6 ciclos de este fármaco. En los pacientes  $\geq$  65 años, fue la resección completa o subtotal la que demostró ser factor predictivo y sin embargo, el tratamiento con TMZ no tuvo impacto significativo.
- 5) El haber recibido algún tipo de tratamiento demostró beneficio significativo en la supervivencia global. Además, los pacientes tratados con TMZ en monoterapia vivieron más que los pacientes que no recibieron TMZ en monoterapia y los resultados con 6 o más ciclos de TMZ fueron significativamente mejores que con < 6 ciclos de este fármaco.
- 6) El tipo de cirugía tuvo impacto en la supervivencia: los pacientes a los que se les practicó una resección completa o subtotal vivieron más que los pacientes a los que solo se les hizo una resección parcial o biopsia.
- 7) El estado general demostró ser un factor pronóstico negativo: aquellos pacientes con peor estado general vivieron menos significativamente que los que tenían mejor estado general.
- 8) En aquellos pacientes que recibieron algún tipo de tratamiento complementario, los pacientes que tenían la metilación de MGMT no vivieron más ni recayeron o progresaron más tarde que los que no lo tenían y tampoco tuvo impacto en la respuesta al tratamiento. Además, observamos que los resultados en recaída y supervivencia en los que recibieron más tratamiento con temozolomida (TMZ) y tenían la MGMT metilada, no fueron mejores que en los que no tenían la metilación.

- 9) En nuestra población, no se ha demostrado que la supervivencia sea menor si el paciente es de más edad al diagnóstico y tampoco se ha demostrado que el estado de metilación de la MGMT influya en la supervivencia dependiendo de la edad.







---

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 1-Hess, K. R., Broglio, K. R. & Bondy, M. L. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977–2000. *Cancer* 101, 2293–2299 (2004).
- 2- Haley Gittleman. Survivorship in adults with malignant brain and other central nervous system tumor from 2000-2014. *Neuro-Oncology* 2018, may 29
- 3- Epidemiologia de los tumores primarios del sistema nervioso. Neurowikia.
- 4- Louis et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*. vol 1 March 09, 2016
- 5- Arvold et al. Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient. *Clinical interventions in Aging* 214:9 357-367
- 6- Brown TJ, Brennan MC, Li M, Church EW, Brandmeir NJ, Rakszawski KL, Patel AS, Rizk EB, Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. Suki D, Sawaya R, Glantz M SO *JAMA Oncol.* 2016 Nov;2(11):1460-1469.
- 7- Prognostic Implications of Extent of Resection in Glioblastoma: Analysis from a Large Database.AU Trifiletti DM, Alonso C, Grover S, Fadul CE, Sheehan JP, Showalter TN SO *World Neurosurg.* 2017;103:330. Epub 2017 Apr 17.
- 8- Walker MD, Green SB, Byar DP, et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med*1980; 303:1323–29.
- 9- Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 2002;359:1011-1018
- 10- Stupp et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005, 352;10: 987 – 996
- 11- Stupp et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 459–66
- 12- Chamberlain MC and Kormanik PA (1998) Practical guidelines for the treatment of malignant gliomas. *West J Med* 168: 114-120
- 13- Br J Cancer. 2000 Sep;83(5):588-93.A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse.Yung WK1
- 14- Ficha técnica Avastin. [www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/.../WC500029271.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/.../WC500029271.pdf)
- 15- Friedman HS et all. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4733. Epub 2009 Aug 31.
- 16- Cloughesy T et al.Updated safety and survival of patients with relapsed glioblastoma treated with bevacizumab in the BRAIN study (abstract #2008) *J Clin Oncol.* 2010;28:181s.

- 17-Taal W et al. Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Aug;15(9):943-53. Epub 2014 Jul 15.
- 18- European Medicines Agency. Refusal of a change to the marketing authorisation for Avastin (bevacizumab). 26 de septiembre de 2014 EMA/577647/2014, EMEA/H/C/000582/II/0059
- 19- Chinot o. et al. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med* 2014;370:709-22.
- 20- Gilbert MR et al. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med* 2014;370:699-708.
- 21- Bastien et al. Molecular Characterizations of Glioblastoma, Targeted Therapy, and Clinical Results to Date. *Cancer*; 2014 , 121: 502-16
- 22-Tumores cerebrales, manual práctico 2008, Carmen balaña , Ioannis Roussos, Gaspar Reynes y col, pag 201-203
- 23-Oncogenic activity of SOX1 in glioblastoma .Matheu et al. *Scientific reports* ([www.nature.com/scientific reports](http://www.nature.com/scientific reports)); article 7, nº 46575. 20 abr 2017.
- 24- Eckel-Passow J et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N ENG j Med* 372; 26: 2499 – 2508.
- 25- Esteller M et al; CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* (2002) 21, 5427 – 5440
- 26- The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, vol 455: 1061 – 1068 (2008)
- 27- Parson DW et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme . *Science* 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.
- 28-Verhaak R et al.Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 . *Cancer Cell.* 2010 Jan 19;17(1):98-110.
- 29- Goldman M. CpG islands. *Encyclopedia of Genetics*; 2001: 477
- 30- Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a boomingpresent, a brighter future. *Oncogene* (2002) 21,5427 – 5440
- 31- Noushmehr H et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell.*2010 May 18; 17(5): 510–522
- 32- Toyota et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 8681–8686, July 1999 *Medical Sciences*
- 33- Fuso A. Aging and disease: Epigenetics bridge. *Epigenetics and Human disease*; Chapter 26; 2012. Pg 519-544
- 34- J. Miller et al. Isocitrate Dehydrogenase-Mutant Glioma: Evolving Clinical and Therapeutic Implications *Julie, Cancer Month* 00, 2017

- 35- TCGA. Comprehensive, Integrative, Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 2015; 372:2481-98
- 36- Hegi et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *n engl j med* 352;10: 997 – 1003 (2005).
- 37- Hegi ME, Diserens A-C, Godard S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1871-4.
- 38- Malmström et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomized, phase 3 trial *Lancet Oncology* 2012; 13:916-26.
- 39- Wick W, Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 707–15.
- 40- Perry JR et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med* 2017; 376:1027-37.
- 41- Wick et al. MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 372–385 (2014).
- 42- Wick et al. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology* 81, October 22 2013, 1515 – 1522.
- 43- Molenaar et al. The combination of IDH-1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro-Oncology* 2014; 0, 1-11.
- 44- Wick W et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 10;27(35):5874-80.
- 45- Wick et al. Long-term analysis of the NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with PCV or temozolomide. *Neuro Oncol.* 2016 Nov;18(11):1529-1537. Epub 2016 Jul 1.
- 46- Van den Bent MJ et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol.* 2013 Jan 20;31(3):344-50. doi: 10.1200/JCO.2012.43.2229. Epub 2012 Oct 15.
- 47- Weller, M. et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 39–51 (2010); published online 8 December 2009.
- 48- Dobes M et al. Increasing incidence of glioblastoma multiforme and meningioma, and decreasing incidence of Schwannoma (2000–2008): Findings of a multicenter Australian study. *Surgical Neurology International* 2011 vol 2 , pg 176
- 49- Mason et al. Glioblastoma in the elderly: making sense of evidence. *Neuro-Oncology Practice* 3(2), 77-86, 2016

- 50- Reifenberger et al; Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int j Cancer*: 131, 1342-1350 (2012).
- 51- Piccirilli et al. Treatment of glioblastoma multiforme in the elderly. *Tumori* 2006, 92: 98
- 52- Mur P et al. Impact prognosis of the regional distribution of MGMT methylation with respect to the CpG island methylator phenotype and age in glioma patients. *J Neurooncology* 122: 441-450 (2015)
- 53- Karnofsky, David A.; Abelmann, Walter H.; Lloyd F., Craver; Burchenal, Joseph H. (1948). «The use of the nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma. With particular reference to bronchogenic carcinoma». *Cancer* 1 (4): 634-656.
- 54- ↑ Folstein, M., Folstein, S.E., McHugh, P.R. (1975). "Mini-Mental State" a Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician. *Journal of Psychiatric Research*, 12(3); 189-198.
- 55- CTCAE (NCI, versión 4.0 may 29 2009)
- 56- Quillien et al. Validation of the high-performance of pyrosequencing for clinical MGMT testing on a cohort of glioblastoma patients from a prospective dedicated multicentric trial. *Oncotarget* 2016; 7(38):61916-61929, *Clinical Neuropathol* 2015; 5: 250-257
- 57- Wick W et al. MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 372-385
- 58- Declaración de Helsinki de la AMM – Principios Eticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Página web de la WMA (World Medical Association), 21 marzo de 2017
- 59- Ministerio de Justicia. Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos (LOPD) y su Reglamento de desarrollo aprobado por el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre. BOE, nº 17, 19/01/2018 (ref. BOE-A-2008-979)
- 60- Sonia YP et al Feasibility and safety of extended adjuvant temozolomide beyond six cycles for patients with glioblastoma . *Hong Kong Med J* 2017;23:594–8
- 61- Menal Bhandari .Comparative Study of Adjuvant Temozolomide Six Cycles Versus Extended 12 Cycles in Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme . *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017 May, Vol-11(5): XC04-XC08
- 62- Amelie Darlix et al. Prolonged Administration of Adjuvant Temozolomide Improves Survival in Adult Patients with Glioblastoma *ANTICANCER RESEARCH* 33: 3467-3474 (2013)
- 63- Rodica Anghel. Improved survival rate in patients with glioblastoma who underwent more than six cycles of temozolomide in a multimodal treatment scheme. Abstract number E13008. ASCO 2014, Anual Meeting
- 64-Stella Chen et al. CADTH RAPID RESPONSE REPORT: SUMMARY WITH CRITICAL APPRAISAL .Extended Dosing (12 Cycles) of Adjuvant Temozolomide in Adults with Newly Diagnosed High Grade Gliomas: A Review of Clinical Effectiveness, Cost- Effectiveness, and Guidelines
- 65- Batchelor T et al. Management of glioblastoma in older adults. Up to date.

- 66- E. BERGO et al. Neurocognitive functions and health-related quality of life in glioblastoma patients: a concise review of the literature. *European Journal of cancer Care* 2015; accepted 1 october 2015
- 67- Yin A et al. The predictive but not prognostic value of MGMT promoter methylation status in elderly glioblastoma patients: A meta-analysis. *PLOS ONE*, January 2014, vol 9, issue 1, e85102
- 68- Zhao Y et al. The clinical significance of O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase promoter methylation status in adult patients with glioblastoma: A meta-analysis. *Frontiers in Neurology*, March 2018, vol 9, article 127
- 69- Cancovic et al. The role of MGMT testing in clinical practice. A report of the association for molecular pathology. *The journal of molecular diagnostics*, vol 15, n° 5, sept 2013
- 70- Weller, M. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network . *Journal of Clinical Oncology* 2009 (27) 5743-5750.
- 71- Rocca A et al. Defining the cutoff value of MGMT gene promoter methylation and its predictive capacity. *Journal of Clinical Oncology* 33, no. 15\_suppl (May 20 2015) 2017-2017.
- 72- Brandes A et al. Temozolomide Concomitant and Adjuvant to Radiotherapy in Elderly Patients With Glioblastoma Correlation With MGMT Promoter Methylation Status. *Cancer* 2009;115:3512–8
- 73- Rapkins et al; The MGMT promoter SNP rs16906252 is a risk for MGMT methylation in glioblastoma and is predictive of response to temozolomide. *Neuro-Oncology* 17 (12), 1589-1598, 2015
- 74- Zhang et al. miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. *Neuro-Oncology* 14(6):712-719, 2012





## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

GBM: Glioblastoma Multiforme

SNC: Sistema Nervioso Central

CAV: Comunidad Autónoma Vasca

EPIC: European Prospective Investigation of Cancer

TAE: Tasa Ajustada por Edad

OMS: Organización Mundial de la Salud

WHO: World Health Organization

RM: Resonancia Magnética

NCIC: National Cancer Institute of Canada

EORTC: European Organization of Research and Treatment of Cancer

TMZ: Temozolomida

RT: Radioterapia

MTIC: Monometil Triazenoimidazol Carboxamida

ADN: Acido Desoxirribonucleico

MGMT: (6)-metilguanina ADN-metil transferasa

VEGF: Vascular Endotelial Growth Factor

EU: European Union

FDA: Food & Drugs Agency

EMA: European Medicines Agency

TCGA: Cancer Genome Atlas

EGFR: European Growth Factor receptor

PDGFR: Platelet Growth Factor Receptor

RTK: Receptor Tirosin Kinasa

MDM: Murine Doble Minute

pRb: Protein Retinoblastoma

IDH: Isocitrato Dehidrogenasa

TERT: Telomerase Reverse Transcriptor

ALT: Alargamiento Alternativo de los Telómeros

HIF: Hypoxia Inductor Factor

RNA: Ribonucleic Acid

PCR: Polymerase Chain Reaction

MSP: Methylation Specific PCR

IK: Karnofsky

MMSE: Mini Mental State Examination

CTCAE Common Terminology Criteria for Adverse Events

IHQ: Inmunohistoquímica

LOPD: Ley Orgánica de Protección de Datos

SLP: Supervivencia Libre de Progresión

SG: Supervivencia Global

OR: Odds Ratio

IC: Intervalo de Confianza

QT: Quimioterapia

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

GWAS: Genome-wide association