

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Programa de Doctorat : Medicina Interna

**Relació i valor pronòstic de la metilació del promotor
del gen MGMT, amplificació del EGFR i mutació
EGFRvIII a una sèrie de pacients amb Glioblastoma**

Treball de Recerca

Director:

Dr. Rafael Rosell Costa

Co-director:

Dra.Carme Balaña Quintero

Alumne :

Olatz Etxaniz Ulatia

Barcelona , setembre 2010

Palabras clave : Glioblastoma, EGFR, factores pronósticos

Paraules clau: Glioblastoma, EGFR, factors pronòstics

ÍNDICE

1. Resumen

2. Introducción

- 2.1 Introducción
- 2.2 Manejo terapeútico
- 2.3 Clasificación Clínica y Molecular
- 2.4 Factores pronósticos clínicos
- 2.5 Biología molecular

3. Objetivos

4. Material y Métodos

- 4.1 Pacientes
- 4.2 Análisis estadístico
- 4.3 Análisis del estado de metilación del MGMT
- 4.4 Detección de la mutación EGFRvIII
- 4.5 Detección de la amplificación del EGFR

5. Resultados

- 5.1 Frecuencias de resultados moleculares
- 5.2 Análisis de la supervivencia global (SG)
- 5.3 Análisis de la SG en relación al estado de metilación del MGMT
- 5.4 Análisis de la SG en relación a la amplificación del EGFR
- 5.5 Análisis de la SG en relación a la mutación EGFRvIII
- 5.6 Análisis del Tiempo a la Progresión (TP) en relación a la metilación del MGMT
- 5.7 Análisis del TP en relación a la amplificación del EGFR
- 5.8 Análisis del TP en relación a la mutación del EGFRvIII
- 5.9 Análisis multivariante de SG
- 5.10 Análisis multivariante de TP

6. Discusión

7. Conclusiones

8. Bibliografía

1.- RESUM

Relació i valor pronòstic de la metilació de la metilguanin transferasa (MGMT), amplificació del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) i mutació EGFR vIII en una sèrie de pacients amb Glioblastoma

Introducció.

La metilació de l'enzim MGMT és un factor predictiu de resposta en pacients amb gliblastoma tractats amb alquilants, però el seu valor pronòstic s'està estudiant . Tanmateix, en el cas de l'amplificació de l'EGFR i la mutació EGFRvIII no se s'ha demostrat cap mena de valor pronòstic ni predictiu.

Objetius.

Determinar la distribució de la metilació de l'enzim MGMT , amplificació de l' EGFR i mutació EGFR vIII , l'associació entre ells i avaluar la supervivència global i supervivència lliure de progresió en relació amb l'estat de metilació del MGMT , amplificació de l'EGFR mutació EGFR vIII .

Material i mètodes.

S'hi han determinat les variacions genètiques en una població de 70 pacients amb gliblastoma i s'han relacionat, a més, amb la supervivència global i temps a la progressió.

Resultats.

La metilació del MGMT , amplificació de l' EGFR i detecció de l' EGFR vIII foren detectats en un 38,6 % , 50% y 25,7% dels pacients , respectivament. No es va demostrar pas cap relació entre l'estat de metilació del MGMT i l'estat de l' EGFR , a diferència de la relació entre l'amplificació de l' EGFR i la mutació EGFRvIII. En l'anàlisi multivariant de supervivència global i temps a la progressió, els factors edat , radioteràpia i metilació del MGMT foren significatius. .

Conclusions.

L'estat de metilació del MGMT és, doncs, un factor pronòstic de supervivència en pacients diagnosticats de gliblastoma tractats amb radioteràpia i quimioteràpia basada en alquilants , a diferència de l'amplificació de l' EGFR i mutació EGFRvIII.

1.- RESUMEN

Relación y valor pronóstico de la metilación de la metilguanina transferasa (MGMT) , amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y mutación EGFR VIII en una serie de pacientes con Glioblastoma

Introducción

La metilación de la enzima MGMT es un factor predictivo de respuesta en pacientes con glioblastoma tratados con alquilantes , pero su valor pronóstico está siendo estudiado . En cambio en el caso de la amplificación del EGFR y la mutación EGFRvIII no se ha demostrado valor pronóstico ni predictivo.

Objetivos

Determinar la distribución de la metilación de la enzima MGMT , amplificación del EGFR y mutación EGFR VIII , la asociación entre ellos y evaluar la supervivencia global y supervivencia libre de progresión en relación al estado de metilación del MGMT , amplificación del EGFR y mutación EGFR VIII .

Material y Métodos

Se determinaron las variaciones genéticas en una población de 70 pacientes con glioblastoma y se correlacionaron con la supervivencia global y tiempo a la progresión.

Resultados

La metilación del MGMT , amplificación del EGFR y detección del EGFR VIII fueron detectados en un 38,6 % , 50% y 25,7% de los pacientes , respectivamente. No se demostró asociación entre el estado de metilación del MGMT y el estado del EGFR , a diferencia de la relación entre la amplificación del EGFR y la mutación EGFRvIII. En el análisis multivariante de supervivencia global y tiempo a la progresión los factores edad , radioterapia y metilación del MGMT fueron significativos .

Conclusiones

El estado de metilación del MGMT es un factor pronóstico de supervivencia en pacientes diagnosticados de glioblastoma tratados con radioterapia y quimoterapia basada en alquilantes , a diferencia de la amplificación del EGFR y mutación EGFRvIII.

2.- INTRODUCCIÓN

El Glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor primario cerebral más frecuente y agresivo en los adultos , el cual representa el 12- 15% de los tumores intracraneales y 50 -60% de los tumores primarios cerebrales [1].

Presenta una incidencia aproximada de 6 casos por cada 100.000 habitantes al año en España, lo que significa que se producen anualmente más de 2.400 nuevos afectados . Suele ser más elevada en pacientes varones con edad avanzada y es más frecuente en la raza blanca . El pico de edad al diagnóstico se encuentra entre 50-70 años [2]. En cuanto a la etiología, no se ha identificado una causa directa relacionada con el desarrollo del GBM.

La OMS clasifica el GBM , en base al origen glial del mismo, como astrocitoma grado 4 , siendo un tumor altamente anaplásico y pobremente diferenciado que se caracteriza por presentar proliferación microvascular y necrosis , con una gran capacidad de infiltrar de forma difusa los tejidos adyacentes [3].

El GBM se trata de un tumor con una alta agresividad por su carácter invasivo e impredecible quimiosensibilidad dando a lugar una rápida progresión hacia la muerte . Suele causar una sustancial morbilidad en forma de cefalea, crisis comiciales y déficits neurológicos. Los síntomas más frecuentes en el momento del diagnóstico son el déficit neurológico , la pérdida de fuerza motora , la cefalea , cambios en el estado mental y la aparición de crisis comiciales [4].

La cirugía y la radioterapia son considerados los tratamientos principales , aportando así una mejoría en la calidad de vida y en la supervivencia (en el caso de la radioterapia) [5] .

A pesar de éstos tratamientos se trata de una enfermedad incurable dada su capacidad de infiltrar tejidos adyacentes, por lo que hasta hace unos años , la supervivencia global era menor a 12 meses con una supervivencia a dos años entre 5- 10% .

En la actualidad la supervivencia tanto global (14,6 meses) como la supervivencia a 5 y 2 años han mejorado de forma significativa (salvo en la clase RPA V, que más adelante explicaremos) gracias al *esquema Stupp* , establecido ya como tratamiento estándard en el paciente diagnosticado de GBM [6], ver tabla 1.

Resultados del tratamiento GB 5 años					
CLASE RPA		TRATAMIENTO	% SUP 2años	% SUP 5años	median a
III	Edad <50, PS 0-1	RT	20,5	6,8	14,8
		RT+TMZ	40,5	28	18,7
IV	Edad<50, PS 2 Edad ≥50, MMS≥27 y resección	RT	11,3	1,6	13,3
		RT+TMZ	29,1	8,9	16,6
V	Edad≥50, MMS<27, y sólo biopsia	RT	6,3	0	9,1
		RT+TMZ	18,2	3,4	10,7
TODOS		RT	10,9		12,1
		RT+TMZ	27,2		14,6

Tabla 1. Supervivencia global en pacientes tratados con radioterapia sóla o en combinación con temozolamida por subgrupos clínicos pronósticos (RPA).

Manejo terapéutico

La cirugía es el primer escalón en el manejo del GBM , seguido por la radioterapia y la quimioterapia sistémica. La resección debe ser lo más amplia posible , siendo difícil de llevar a cabo una resección completa debido, en ocasiones , a la elocuencia de la zona y a la capacidad de infiltración al tejido adyacente.

Sus objetivos serán la obtención de material para el estudio histológico y conseguir una descompresión rápida mejorando así los síntomas neurológicos [7].

La radioterapia fraccionada externa postoperatoria es fundamental en el manejo del GBM. Iniciada a las 2-5 semanas de la cirugía, la dosis recomendada es de 60 Gy administrada en 30 fracciones durante 6 semanas.

En la actualidad el tratamiento estándar consiste en realizar una resección tumoral, lo más amplia posible, seguida de quimioradioterapia con temozolamida (75mg/m² /d) y después quimioterapia con temozolamida (150 – 200 mg/m² / d 1-5 cada 28 d) durante 6 meses .

Como alternativa al tratamiento adyuvante en GBM de recién diagnóstico tratados mediante cirugía y radioterapia , otra opción de tratamiento es la colocación intraoperatoria en el lecho quirúrgico de implantes de carmustina (Gliadel) seguido de radioterapia , presentando así mejoría en la tasa de supervivencia respecto al mismo tratamiento sin la colocación del implante [8], sin embargo dicho tratamiento nunca se ha comparado con el nuevo estándar.

Clasificación Clínica y Molecular

En función de una serie de hallazgos clínicos y moleculares (diferentes mecanismos genéticos de tumorigénesis) , los GBMs se han clasificado en primarios (de novo) y secundarios .

Los GBM primarios (sin antecedente de glioma de menor grado) representan más del 90% de los tumores y son más frecuentes en el sexo masculino (hombre : mujer,2:1) siendo la edad media de presentación los 62 años . Los GBM secundarios (con antecedente de glioma de menor grado, grado OMS 2/3) representan menos del 5% y son más frecuentes en el sexo femenino (mujer : hombre , 2:1) con una edad media de presentación de 45 años [9].

En cuanto al perfil molecular , existen alteraciones genéticas comunes entre los dos tipos de GBM y otras que los diferencian. El GBM primario se relaciona con genes que poseen propiedades similares a las “stem cell” estromales y mesenquimales, en cambio el GBM secundario se relaciona con genes relacionados con la fase mitótica del ciclo celular [10,11].

El **GBM primario** se desarrolla rápidamente y se caracteriza por la amplificación o sobreexpresión del factor de receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) [12] y pérdida del gen supresor PTEN [13].

El **GBM secundario** se desarrolla lentamente a partir de un tumor glial de bajo grado (grado OMS 2) o de un tumor glial anaplásico (grado OMS 3), los cuales poseen mutaciones en el gen p53 y sobreexpresión del factor de receptor de crecimiento plaquetario (PDGFR) [14], por lo tanto las alteraciones genéticas en un glioma de bajo de grado conducirán a una transformación anaplásica de grado superior (astrocitoma anaplásico o GBM).

En la transformación a *astrocitoma anaplásico* estarán implicados moléculas de la regulación del ciclo celular como son , la mutación o delección del gen inhibidor p16 INK4A / CDLN2A o el gen del retinoblastoma (pRB1), así como la amplificación o sobreexpresión del CDK4/6 y HDM2.

En cambio en la transformación a *GBM secundario* estará implicada la delección del cromosoma 10 , el cual implica el gen PTEN (figura 1, [15]).

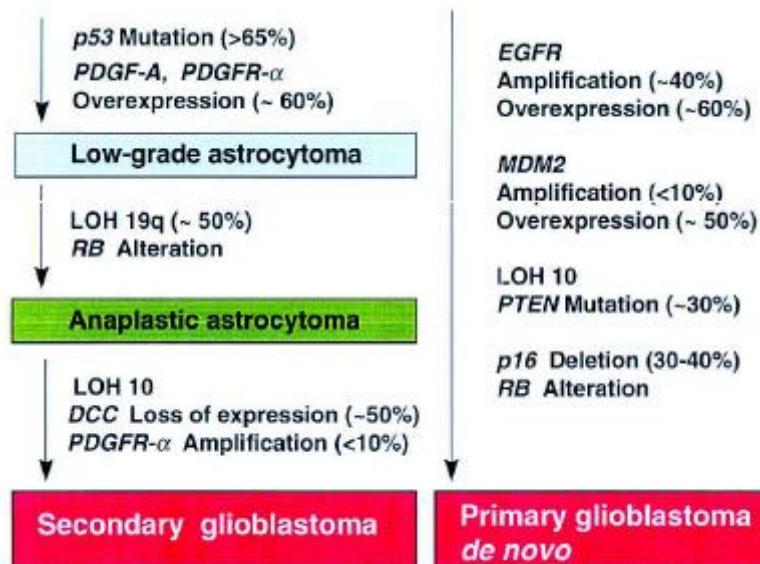


Figura 1 . Alteraciones genéticas en el desarrollo de el GBM primario y secundario .
(Neuroncology, 1999, Jan 44-59)

A pesar de la similitud fenotípica entre el GBM primario y secundario ambos se encuentran implicados en diferentes patrones de transcripción génica , por lo que aunque respondan de forma semejante a la terapia citotóxica convencional se piensa que la respuesta a terapias diana sea diferente .

Aunque la clasificación histológica sigue siendo morfológica han empezado a aparecer clasificaciones moleculares de los gliomas que probablemente distinguirán mejor los subtipos y pueden tener implicaciones terapeúticas y pronósticas (ver más adelante).

Factores pronósticos clínicos

El pronóstico en los GBMs en general es pobre . Por otro lado se han identificado factores pronósticos favorables como la edad joven , un estado general óptimo (performance status , PS) , una amplia extensión quirúrgica , y posiblemente el tipo y la duración de los síntomas .

Tras haber demostrado la eficacia del esquema combinado respecto a radioterapia sola , en el estudio comparativo fase III realizado por parte de EORTC y NCIC en GBM (mencionado antes como Stupp) de recién diagnóstico , la EORTC validó una clasificación clínica pronóstica (RPA) que previamente había definido la RTOG , teniendo en cuenta la edad, estado general (índice de karnosky , PS), extensión de la cirugía y Mini- mental status (MMSE).

Los grupos se definen como de clase III, IV y V (de mejor a peor pronóstico) dependiendo de las variables previamente mencionadas (figura 2).

Esto es , la clase RPA III se definiría como el paciente de menos de 50 años con PS 0, la clase RPA IV correspondería al paciente de menos de 50 años pero con PS 1-2 o paciente mayor o igual a 50 años con un MMSE mayor o igual a 27 tratado con cirugía parcial , y la clase RPA V correspondería a paciente mayor o igual a 50 años con MMSE mayor o igual a 27 pero sólo biopsiado , o también paciente con MMSE < 27 (tabla 2) , [16] .

Figure 2 RPA class definitions

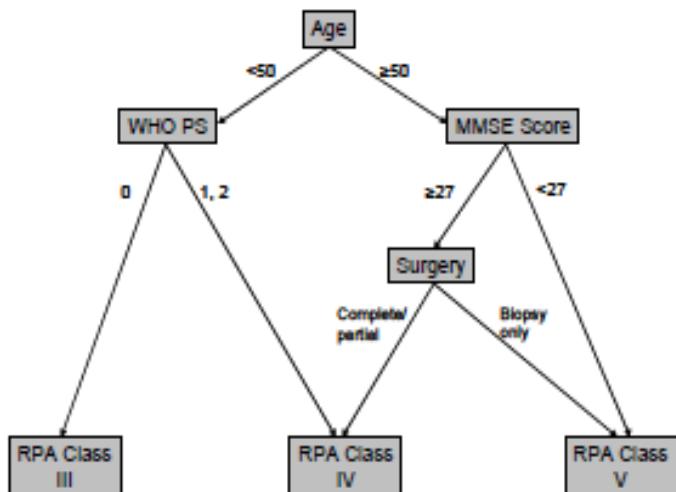


Table 1. Original and Adapted RTOG/EORTC RPA Class III-V

RPA Class	RTOG (original)	EORTC (adapted)
III		
Age, years	< 60	< 60
Tumor type	Anaplastic astrocytomas	Glioblastoma multiforme
Mental status	Abnormal	
Performance status or		WHO PS 0
Age, years	< 60	
Tumor type	Glioblastoma multiforme	
Performance status	KPS 90-100	
IV		
Age, years	< 60	< 60
Tumor type	Glioblastoma multiforme	Glioblastoma multiforme
Performance status	KPS < 90	WHO PS 1-2
or		
Age, years	≥ 60	≥ 60
Tumor type	Anaplastic astrocytomas	Glioblastoma multiforme
Performance status	KPS 70-100	
Treatment status	≤ 3 from time of first symptom to start of treatment	Complete/partial surgery
Mental status		MMSE ≥ 27
or		
Age, years	≥ 60	
Tumor type	Glioblastoma multiforme	
Mental status	Good neurologic function	
Treatment status	Surgical resection	
V		
Age, years	≥ 60	≥ 60
Tumor type	Glioblastoma multiforme	Glioblastoma multiforme
Performance status	KPS 70-100	
Mental status	Neurologic function that inhibits the ability to work	MMSE < 27
Treatment status	Surgical resection or biopsy only followed by at least 54.4 Gy radiotherapy	Biopsy only
or		
Age, years	≥ 60	
Tumor type	Glioblastoma multiforme	
Performance status	KPS < 70	
Mental status	Normal	

RTOG, Radiation Therapy Oncology Group; EORTC, European Organisation for Research and Treatment of Cancer; RPA, recursive partitioning analysis; PS, performance status; KPS, Karnofsky performance status; MMSE, MiniMental Status Examination.

Tabla 2. Subclases de RPA originales y adaptados por la RTOG y EORTC respectivamente.

JCO. 2006, 4;2563-69.

Después de realizar el análisis por subgrupos , la eficacia del tratamiento combinado se mantuvo en todas las clases RPA (III, IV , V) en cuanto a supervivencia global con 17, 15 y 10 meses , respectivamente y supervivencias a 2 años de 32%, 19% y 11% respectivamente.

Cabe destacar que en el grupo RPA V no se demostraron diferencias significativas en términos de supervivencia tanto global como a dos años entre las dos ramas, a diferencia de los grupos RPA III y IV .

Por lo tanto , se podría decir que nos encontramos frente a una clasificación pronóstica , sin poder descartar realizar tratamiento por pertenecer a un grupo de mal pronóstico . Además puede ser útil de cara a comparar los resultados dentro de los estudios .

BIOLOGIA MOLECULAR del GBM

Originado de las células gliales , la patogénesis del GBM se constituye por una serie de procesos implicados en múltiples alteraciones genéticas dando a lugar a la activación de señales de transducción relacionados con receptores tirosin kinasa , como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el derivado de plaquetas (PDGFR) [20], fundamentales en el desarrollo de los gliomas y mediados por las cascadas de señalización intracelular PIK3- AKT- mTOR y Ras-MAPK.

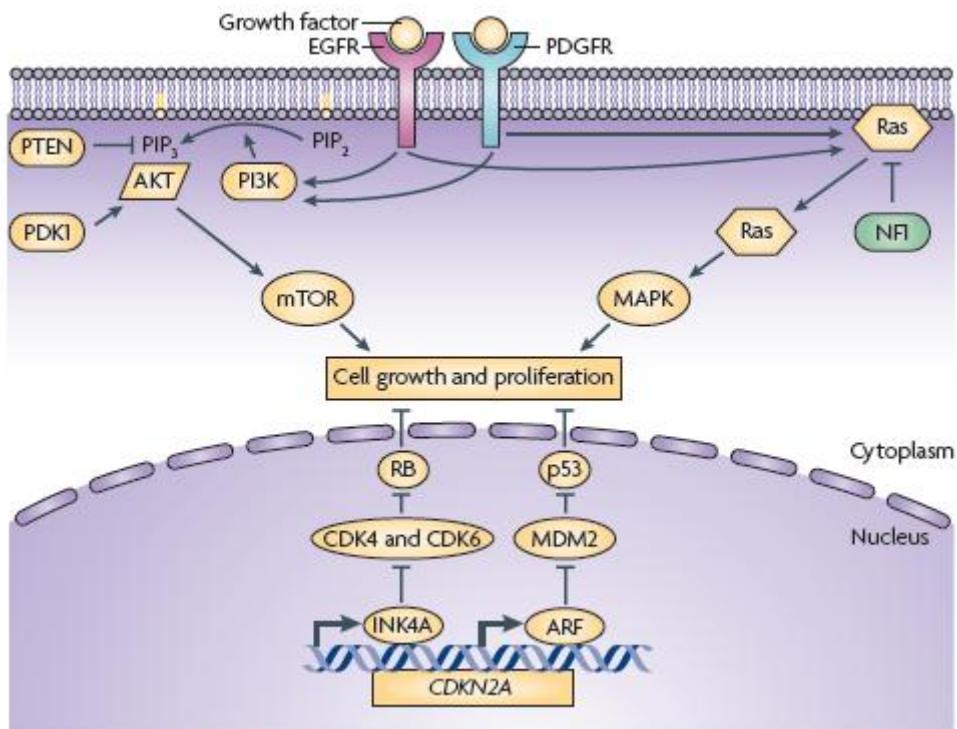
Los componentes del Ras- MAPK y PIK3-AKT- mTOR se encuentran activados en la mayoría de los GBM asociado a la alteración génica del PTEN.

La activación del AKT se encuentra presente en un 80% de los GBM y la delección o mutación del gen PTEN (tensina homóloga delecionada localizada en el cromosoma 10 , inhibidora de la cascada de señalización PIK3-Akt- mTOR) en un 40-50% de los GBM.

El gen p53 y el oncogen supresor RB (retinoblastoma) también se encuentran afectados de forma similar en el GBM en un 87% y 78% , respectivamente.

La cascada del gen RB se encuentra alterada en gliomas de alto grado (tanto de estirpe oligodendrítica y astrocítica) mediante las mutaciones inactivas o la amplificación de sus moléculas inhibidoras tipo kinasa 4 cyclina- dependiente (CDK4) y menos frecuente , CDK6. De forma similar , la amplificación de los antagonistas del gen p53, MDM2 y MDM4 han sido encontrados, así como mutaciones o delecciones en el locus CDKN2A (el cual codifica proteínas reguladoras estimuladoras del Rb y p53 , como son INK4A y ARF).

Por otro lado , mutaciones o delecciones del NF1 (neurofibrim-1 gen supresor asociado a la neurofibromatosis tipo 1) se han encontrado en un 15-18% de los GBM esporádicos y parece que estén relacionados con un subtipo de glioma [28].



Vías de señalización molecular implicadas en la patogénesis del GBM. La señalización onco-génica mediante los receptores tirosin kinasa (RTK), como el EGFR y el PDGFR está mediada por la cascada PI3K- AKT- mTOR y Ras- MAPK. Los defectos en las cascadas donde intervienen oncogenes supresores como el gen p53 y el gen RB, también se encuentran implicados. También se observan los diferentes niveles de alteración proteínica , los cuales definen las subclases moleculares de los gliomas : EGFR (rojo), PDGFR (azul), y NF-1 (verde). CDK, kinasa cyclin- dependiente; NF1, neurofibromina; PDK1, protein kinase 3- fosfoinositol; PIP2, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato;PIP3, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato .

Nature Reviews. 2010 ;10:324.

La amplificación del gen del EGFR frecuentemente coincide con una mutación activa (EGFRVIII). Esta variante del receptor se encuentra presente entre un 50- 60% de los GBM que presentan la amplificación y en un 20-30% de los GBM primarios , siendo el resultado de la delección del exón 2 al exón 7 (dominio proteínico de unión extracelular), y por lo tanto dando a lugar una persistente activación del receptor, y estimulación de la cascada del fosfatidilinositol 3'-kinasa (PI3K) con una activación de la proliferación y supervivencia celular.

La mutación EGFRvIII , dado que no se encuentra en tejidos normales , puede ser una terapia diana como tratamiento antitumoral [21]. Aún así los estudios anti-EGFR realizados en GBM no han sido satisfactorios.

Por otro lado existe , en algunos estudios , evidencia clínica que el EGFRvIII puede predecir respuestas a terapias con inhibidores de la tirosin kinasa (ITK) , como en un estudio realizado en 49 pacientes con GBM recurrente tratados con ITK donde se demostró una asociación entre la respuesta clínica y la coexpresión del EGFRvIII y la forma salvaje (wild type) del gen PTEN , de forma significativa (p< 0,001) [22].

De todas formas su relevancia en cuanto al pronóstico no está claro. En un análisis multivariante realizado en 91 pacientes diagnosticados de GBM donde se agrupaba en grupos definidos como aquellos con pérdida de expresión del EGFR o con sobreexpresión del EGFR o con expresión del EGFR vIII , no demostró diferencias en cuanto a edad, sexo, IK, extensión de la cirugía y administración de la radiación entre los diferentes grupos de pacientes. La supervivencia global en los pacientes con la pérdida de la expresión del EGFR , la sobreexpresión y el grupo que presentaba el EGFR vIII era de 0,96, 0,98 y 1,07 años respectivamente. En cambio aquellos pacientes que sobrevivían más de 1 año estos valores eran de 2,03, 2,02 y 1,21 años (p< 0.0001; comparando el grupo con EGFRvIII con los otros dos grupos).

Por lo tanto el estudio concluyó que ni la sobreexpresión EGFR , ni la EGFRvIII eran factores independiente predictivos de supervivencia global en el cohorte de pacientes estudiados tratados mediante una extensa cirugía , aunque en los supervivientes al año , la expresión del EGFRvIII era un factor pronóstico negativo independiente de supervivencia [23].

Por otro lado, estudios basados en la amplificación del EGFR han sugerido una asociación entre la radioresistencia y la sobrestimulación del EGFR.

En un estudio realizado en la Universidad de California en San Francisco , se analizaron 30 muestras de GBM donde se objetivó que aquellas muestras que no presentaron respuesta a la radioterapia (definido como el aumento del > 50% de captación de contraste) , un tercio de ellas presentaban una alteración genética del EGFR (ganancia cromosómica 7 y 19) y en cambio en las muestras que respondieron a la radioterapia (definido como una reducción > 50% captación de contraste) ninguna presentó alteración alguna en el EGFR (p= 0.05) [24,25].

A raíz de diferentes estudios se han definido subclases moleculares de gliomas malignos , basados en la biología y en los diversos estadios del desarrollo neuroglial .

En el análisis realizado en los gliomas grado III y IV (clasificación OMS) , éstos se dividían en 3 subclases: proneural (similar al sistema nervioso central del feto y adulto), proliferativo (relacionado con células hematopoyéticas stem cells) y mesenquimal (relacionado con células de tejidos blandos como hueso, cartílago sinovial, músculo liso y astrocitos fetales).

Al subtipo proneural corresponderían la mayoría de los gliomas grado III y los GBM (glioma grado IV) diagnosticados en pacientes jóvenes con un curso clínico más largo. En cambio aquellos tumores recurrentes , aunque conservaban sus características génicas previas , pertenecían al subtipo mesenquimal [26].

En cambio en un análisis realizado en gliomas primarios grado IV (GBM) , éstos se dividían en 4 subtipos : proneural , mesenquimal , clásico y neural. El clásico , proneural y mesenquimal estaban relacionados con alteraciones genéticas del EGFR (25-30%) , PDFGR, IDH-1 o IDH-2 (25 – 30%) o NF1 (30 – 40%) [27].

Analysis of WHO grade III and IV glioma variants⁸⁸	Analysis of primary glioblastomas⁹¹	Analysis of primary glioblastomas, some WHO grade II and III gliomas and secondary glioblastomas⁹⁰	Canonical genomic aberration	Relevant mouse model
Proneural	Proneural	PDGF	<ul style="list-style-type: none"> • PDGFR amplification or mutation • IDH1 or IDH2 mutation 	Localized PDGFB expression combined with genetically engineered tumour suppression loss ¹⁷⁴
Mesenchymal*	Mesenchymal	NF1	NF1 deletion or mutation	Localized deletion of <i>Nf1</i> and <i>Trp53</i> in the mouse SVZ ⁶³
	Classical	EGFR	EGFR amplification or mutation	Localized EGFR VIII expression combined with genetically engineered tumour suppressor loss ⁵⁹
Subclass not defined in this study	Neural	Unclassified	Unknown	None

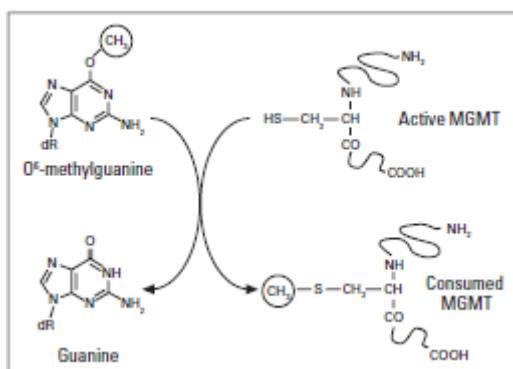
Subclases moleculares de gliomas de alto grado de diferentes estudios. EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico;IDH, isocitrato deshidrogenasa; NF1, neurofibromin1; PDGF, factor de crecimiento derivado plaquetario; SVZ, zona subventricular;VIII , variante III; WHO , Organización Mundial de la Salud . *Nature Reviews. 2010,10 :325*

Esta agrupación de tipo trascisional sugiere que a pesar de la heterogeneidad genómica , los gliomas que pertenecen a un subtipo están relacionados con la misma cascada de señalización , y por lo tanto pueden ser susceptibles de una misma terapia diana [28].

Sólo mencionar que se han hecho varias observaciones importantes sobre las mutaciones del gen IDH1 (isocitrato deshidrogenasa) en los pacientes con GB; preferentemente ocurren en pacientes jóvenes (edad media, 33 años) con mutaciones del TP53, están presentes en casi todos los sujetos con GB secundarios. Los portadores tienen un mejor pronóstico lo que se traduce en una mediana de SG de 45.6 meses versus 13 meses para aquellos con el genotipo silvestre (IDH1 wild-type; p < 0.001), y su presencia es independiente de la activación de otros oncogenes como BRAF, KRAS y PIK3CA [29,30].

Estado de Metilación del MGMT

La metilación del promotor de la enzima 06-metilguanina metil transferasa (MGMT) determina que la proteína no se exprese o lo que es lo mismo que esté silenciado y por lo tanto las células tumorales sean incapaces de reparar ciertos defectos del ADN inducidos por la quimioterapia con fármacos alquilantes.



El proceso de reparación del ADN mediado por la O6-metilguanintransferasa (MGMT). La enzima MGMT transfiere el grupo metilo desde el aducto ADN del MGMT a un residuo de cisteína , y así se inactiva de forma irreversible.
(JCO .2008, 28 ; 1490)

De todas formas hay que tener en cuenta que no existe una técnica validada para determinar el estado de metilación del MGMT, pero la PCR se considera la técnica más establecida.

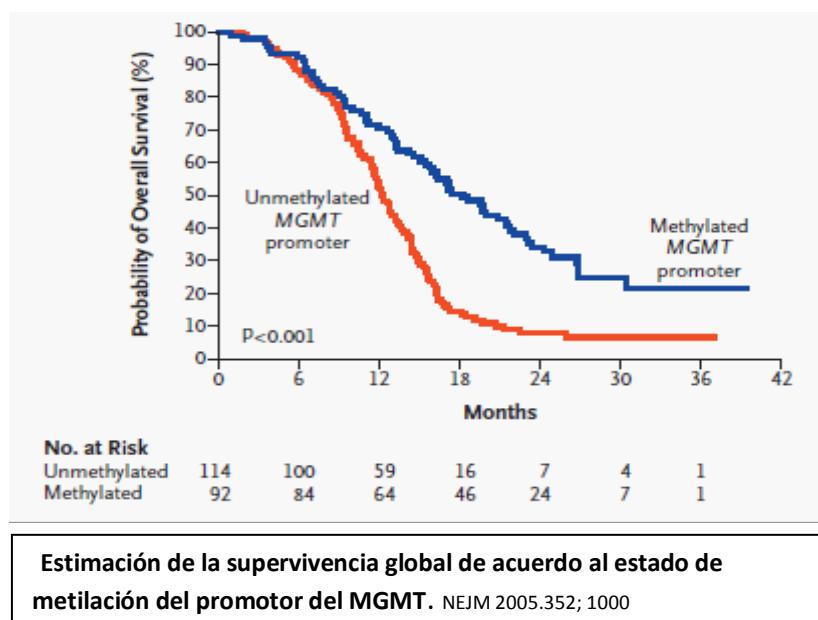
La metilación del promotor del MGMT , determinada por técnica PCR ,se han relacionado con la respuesta a agentes alquilantes y la supervivencia [17], por lo que el estado de metilación del promotor del MGMT ha sido propuesto como factor predictivo de respuesta en pacientes diagnosticados de GBM tratados con alquilantes [18] , estando pendiente de validar su valor pronóstico en estudios adicionales prospectivos .

Este hecho se extrapoló de un análisis retrospectivo de las muestras incluidas en el estudio fase III de la EORTC (previamente mencionado) , en el que se llegó a la conclusión que los pacientes que se beneficiaban del tratamiento combinado con temozolamida y radioterapia, presentaban la metilación del promotor del MGMT, con lo que la mediana de supervivencia era de 21,7 meses y la supervivencia a dos años era de 46% [18] con una clara diferencia

significativa respecto al grupo (también metilado) tratado sólo con radioterapia con una supervivencia global de 15 meses y supervivencia a 2 años de 22,7 % ($p =0.007$).

En contraposición , se observó que los pacientes que carecían de la metilación del promotor del MGMT no se beneficiaban del tratamiento combinado presentando una menor supervivencia global de 12,7 meses y de 11,8 meses ($p =0.06$) en el grupo tratado sólo con radioterapia , y una supervivencia a 2 años de 13,8 % y menor del 2% respectivamente. Lo que llevó a la conclusión de que la no metilación del MGMT es un marcador de resistencia a la temozolamida y a las nitrosureas .

Independiente del tipo de tratamiento realizado, también se observaron diferencias significativas ($p< 0.001$), en cuanto a supervivencia global entre los pacientes metilados y no metilados indicando así el valor pronóstico del estado de metilación del MGMT, destacando una disminución del riesgo de muerte del 55% (HR:0.45 , IC 95% entre 0,32 - 0,61),en el grupo metilado [19] .



Aun así, no existen datos concluyentes para no indicar el tratamiento con temozolamida , y aunque en algunas instituciones se realiza de forma rutinaria la determinación del estado de metilación del promotor del gen MGMT, ésta no se ha convertido en una práctica estándar que permita decidir un tratamiento diferente según el resultado.

En la actualidad existe un estudio internacional fase III aleatorizado ya finalizado pero pendiente de análisis, (RTOG 0525-EORTC26052-22053), cuyo objetivo es la confirmación prospectiva del valor de la metilación del promotor del gen MGMT para seleccionar el tratamiento de radioterapia y temozolamida, tomando como criterio de estratificación de pacientes el estado de metilación del MGMT .

3.- OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo son :

1. Determinar , en nuestra población de pacientes , la distribución de la metilación de la enzima MGMT, amplificación del EGFR y mutación EGFR vIII.
2. Determinar la asociación entre el estado de metilación del MGMT y la amplificación EGFR / mutación EGFR vIII.
3. Evaluación de la supervivencia global y tiempo a la progresión en relación al estado de metilación del MGMT , amplificación del EGFR y mutación EGFR vIII .

4.- MATERIAL y METODOS

Pacientes

El estudio incluyó 70 pacientes diagnosticados de GBM tratados en el Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona , Barcelona , España) entre Junio de 1997 y Agosto de 2006 con un seguimiento 13 años . El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Etico de Investigaciones Clínicas y el consentimiento informado para la realización del análisis molecular fue firmado por todos ellos en el momento de la cirugía.

El diagnóstico histológico fue confirmado por dos patólogos del servicio de anatomía patológica . Todos los pacientes fueron tratados mediante biopsia o resección, y posteriormente tratados mediante radioterapia (RT) más quimioterapia basada en BCNU (o Cisplatino/ BCNU pre RDT) , o RDT más quimioterapia basada en Temozolamida (concomitante y adyuvante , sólo adyuvante o con cisplatino como neoadyuvante).

Los pacientes se dividieron en subgrupos según múltiples variables como edad (mayor o igual a 50 años o > 50 años) , IK (mayor o igual a 70 o menor a 70) , tipo de cirugía (biopsia vs resección parcial o completa) , características de RT (no tratamiento , tratamiento a dosis menor de 40 Gy vs dosis hasta 60 Gy) y régimen de quimioterapia (temozolamida vs BCNU).

Como criterio de evaluación de la respuesta se propusieron los criterios de Mc Donald [29] , así como para estimar el beneficio clínico (definido como la suma de respuesta parcial, respuesta completa y estabilización de la enfermedad).

El tiempo a la progresión (TP) fue definido como el intervalo entre el diagnóstico histológico (que corresponde al la fecha de la cirugía) y la progresión , definido como un aumento > 25% del tamaño tumoral , de acuerdo a imágenes realizadas por RMN o una evidencia clínica de deterioro neurológico irreversible .

La supervivencia global (SG) fue definido como el intervalo entre el diagnóstico histológico (fecha de la intervención quirúrgica) y la muerte o último control . La seudoprogresión no se tuvo en cuenta a la hora de valorar la respuesta , dado la escasa evidencia de la misma en el momento del estudio.

Análisis estadístico

Las variables clínicas fueron evaluadas descriptivamente y las relaciones se realizaron por el Test de Chi cuadrado o el test de Fisher de 2 x 2 tablas de contingencia , cuando fuera necesario.

El TP y SG fueron evaluados utilizando el método Kaplan- Meyer y las curvas fueron comparadas utilizando el test log-rank.

El análisis multivariante incluyo factores reconocidos como pronósticos en los gliomas (IK, biopsia vs resección, Radioterapia , tipo de quimioterapia) y el tumor o el estado de metilación del MGMT que fue llevado a cabo mediante el modelo de regresión Cox .

La significancia estadística fue establecida en $p < 0.05$. Todos los análisis fueron llevados a cabo utilizando el SPSS v11 (*Statistical Package for the Social Sciences*) . Por otro lado , el valor del Hazard Ratio (HR) por encima de 1 se consideró como valor significativo.

Métodos

Los pacientes fueron seleccionados para el estudio de :

- a. Metilación de la enzima MGMT mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- b. Detección de la mutación EGFR vIII mediante retrotranscripción PCR.
- c. Amplificación del EGFR (A- EGFR) mediante hibridación fluorescente in situ (FISH).

(a) Metilación de la enzima MGMT

Extracción del ADN del tejido tumoral

Tras realizar la resección, la muestra del tejido tumoral se incluyó en parafina . Una vez realizada la evaluación por parte del servicio de Anatomía Patológica se procedió a realizar los cortes de 10 micras para después mediante microdisección con laser seleccionar las células tumorales. La extracción de ADN se realizó de forma automática mediante Qiacube (Qiagen, valencia,CA)utilizando el kit de Qiagen DNA Mini Blood (Qiagen, Valencia,CA) ,y se resuspendió en un volumen final de 100 microlitros.Tras la extracción se cuantificó y se congeló a -20°C hasta su posterior uso.

Reacción en cadena de la metilación de la polimerasa

La metilación aberrante del ADN se produce en los isletos CpG situados en la región promotora del gen del MGMT (Genbank N. X_61657) fue determinada utilizando la técnica de MSP en la que se diseña unos oligos específicos tanto para el ADN metilado como para el no metilado . Previo a la MSP, y para poder distinguir las dos secuencias se realiza un tratamiento del ADN con bisulfito sódico, que convierte las citosinas no metiladas en Timinas ,siendo las citosinas metiladas resistentes al cambio. Con esta modificación química , se consigue distinguir dos secuencias en función de si la región promotora está o no metilada .

Brevemente , 1 microg de ADN fue desnaturalizado con 0,2 M Na OH ,y después se añadió 10 mM hidroquinona, y 3M bisulfito sódico y se incubó a 55°C durante 16 h .Acto seguido se purifica el ADN con un sistema de purificación basado en vacío , Wizard de ADN Clean-up Sistem (Promega , Madison, WI, USA). Posteriormente, el ADN fue tratado con 3M NaOH y se precipitó a -20°C durante 30 minutos co una relación de 3:0,1:1 de Etanol absoluto, Acetato de sodio 10M y ADN purificado.Trancurrido el tiempo.se centrifugaron las muestras 30 minutos a 12.000 rpm, y actos seguido se limpiaba con 70% de etanol y disuelto en agua .

El ADN modificado por bisulfato fue amplificado utilizando primers específicos mediante MSP. La reacción de PCR se realizó usando la Hot Start de Qiagen siguiendo las instrucciones del manual (Qiagen, valencia,CA) 1x Buffer de PCR,3mM de MgCL y el juego de bisulfite- modified DNA template.

Las muestras (15 microl) de reacciones de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2% teñido de bromido de etidio y visualizados con UV. Si se observaba la banda quiere decir que hay amplificación con la pareja de oligos utilizados.

(b) Detección de la mutación EGFR vIII

Extracción del ARN del tejido tumoral

Una vez se obtuvo la muestra de tejido, ésta se incluyó en parafina para después realizar cortes de 10 micras e iniciar el paso de desparafinación y rehidratación y así poder extraer el ARN con el kit de extracciones “Absolutely RNA® FFPE Kit” .

Determinació de la concentració de ARN

Al acabar la extracción determinamos la concentración de ARN en el espectrofotòmetro y conservamos los ARNs a -80 °C.

Retrotranscripción a cADN

La retrotranscripción se realiza con el kit “Ready-to-go you-prime first-strand beads”. El producto final puede servir directamente para la reacción de PCR, o bien se puede conservar a -20 °C.

Amplificación potPCR

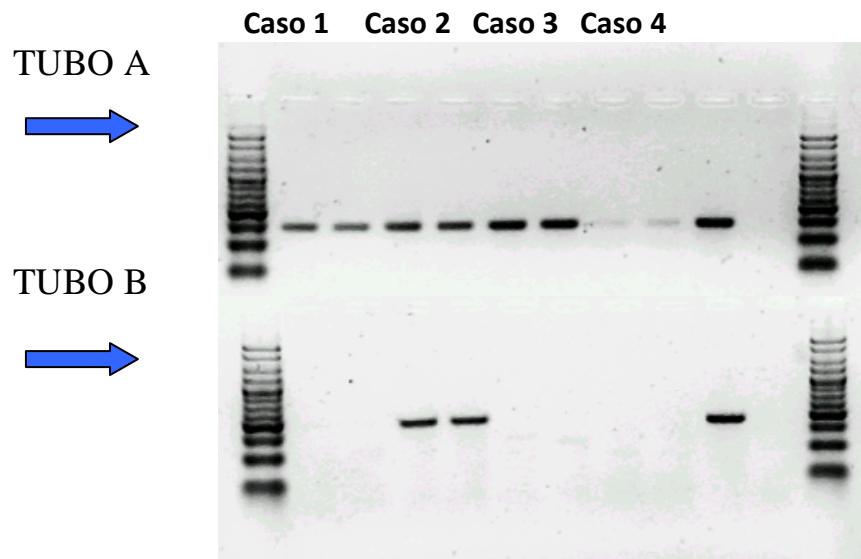
La determinación del EGFR vIII incluye dos análisis de PCR: tubo A con la amplificación del alelo no mutado (sirve como control de calidad) y el tub B con la amplificación del alelo mutado. En cada análisis de PCR debemos incluir cada muestra de cADN por duplicado, un control positivo (muestra con mutación EGFR vIII) y un control negativo: añadir 1 µl de agua en sustitución del cADN. Posteriormente las reacciones de PCR se guardan a 4ºC.

Anàlisis e interpretación de los resultados

Se lleva a cabo la mezcla de 10 µl de cada reacción de PCR con 2 µl de tampón de carga Orange G y se cargan las muestras en un gel de agarosa al 2% con el marcador de PM (25-500 pb).

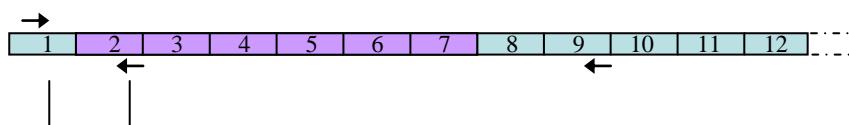
Una banda de 72 pb en la reacción del tubo A indicará la presencia de un alelo normal (sin delección) del gen EGFR y una banda de 88 pb en la reacción del tubo B, indicará la presencia de un alelo mutado, con la delección de los exones 2 a 7 del gen. Los resultados se informan como se indica en la tabla:

Tubo A	Tubo B	Resultado
Banda 72 pb	No banda	NO MUTADO
Banda 72 pb	Banda 88 pb	MUTADO
No banda	No banda	NO VALORABLE



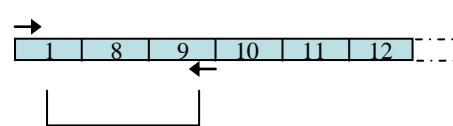
Caso 1= no tiene mutación ,Caso 2= tiene mutación,
Caso 3= no tiene mutación, Caso 4= no tiene mutación

cDNA gen EGFR



Producto de
amplificación en
el alelo no
72 pb

Delección presente
(mutante EGFR vIII)



Producto de
amplificación en el
alelo mutado
88 pb

(c) Anàlisis de la amplificación de EGFR

La FISH es un excelente método para detectar cambios genómicos de EGFR en diversos tipos de preparaciones celulares, incluyendo tejidos parafinados. Como la FISH detecta aberraciones genéticas célula a célula obvia los problemas inherentes a técnicas como PCR y Southern blot, que utilizan ADN derivado de una mezcla de células que puede ser genéticamente heterogénea.

La sonda LSI EGFR/CEP 7 Dual Color está diseñada para detectar y cuantificar el número de copias del gen EGFR (epidermal growth factor receptor gene) localizado en 7p12. El receptor EGF, también conocido como HER-1/erb-B1, es un miembro de la familia EGFR, que también incluye HER-2/erb-B2, HER-3/erb-B3 y HER-4/erb-B4. El gen EGFR codifica una glicoproteína de transmembrana con actividad tirosina kinasa, que presumiblemente desempeña un papel clave en el control de la proliferación celular.

La sonda LSI EGFR/CEP 7 Dual Color es una mezcla de dos sondas: LSI EGFR SpectrumOrange (300 Kb), el cual contiene por completo el gen EGFR y la sonda CEP 7 SpectrumGreen, la cual hibrida el ADN alfa-satélite localizado en el centrómero del cromosoma 7 (7p11.1-q11.1).

Tras realizar la preparación de la muestra tisular mediante un corte (4-6 micras de grosor) de tejido parafinado y calentarlo a 100°C durante 20 minutos y posterior desparafinación e hibridación, se procedió a la preparación de la sonda . Posteriormente se realizó la hibridación y visualización de los resultados.

Expresión de resultados

Se realizó el análisis de las señales de hibridación en el microscopio de fluorescencia. La amplificación se analizó de forma cualitativa , esto es presencia o no de ella.

5.- RESULTADOS

Pacientes

Las características de los pacientes se resumen en la tabla 1. La mayoría de los pacientes eran varones (51,4%) con un 48,6% de mujeres, de edad mayor o igual a 50 años (87,14%) con una mediana de 64 años.

La mayoría presentaban un IK mayor o igual a 70 (88,6%) y fueron tratados mediante una resección parcial o completa (85,7%) y radioterapia estándar a dosis de 60 Gy en 30 fracciones al lecho tumoral y edema (89,9%). Por otro lado, todos los pacientes fueron tratados en su mayoría con quimioterapia basada en temozolamida (58,6%) respecto a quimioterapia basada en BCNU (40%).

SEXO:	Varón Mujer	36 (51.4) 34 (48.6)
EDAD:	≥ 50 < 50	61 (87.1) 9 (12.9)
CIRUGIA:	Biopsia Resección	10 (14.3) 60 (85.7)
KPS:	< 70% ≥ 70%	8 (11.4) 62 (88.6)
QUIMIOTERAPIA	No Basado en BCNU Basado en TMZ	1 (1.4) 28 (40.0) 41 (58.6)
RADIOTERAPIA	No o < 40 Gy 60 Gy	7 (10.1) 63 (89.9)

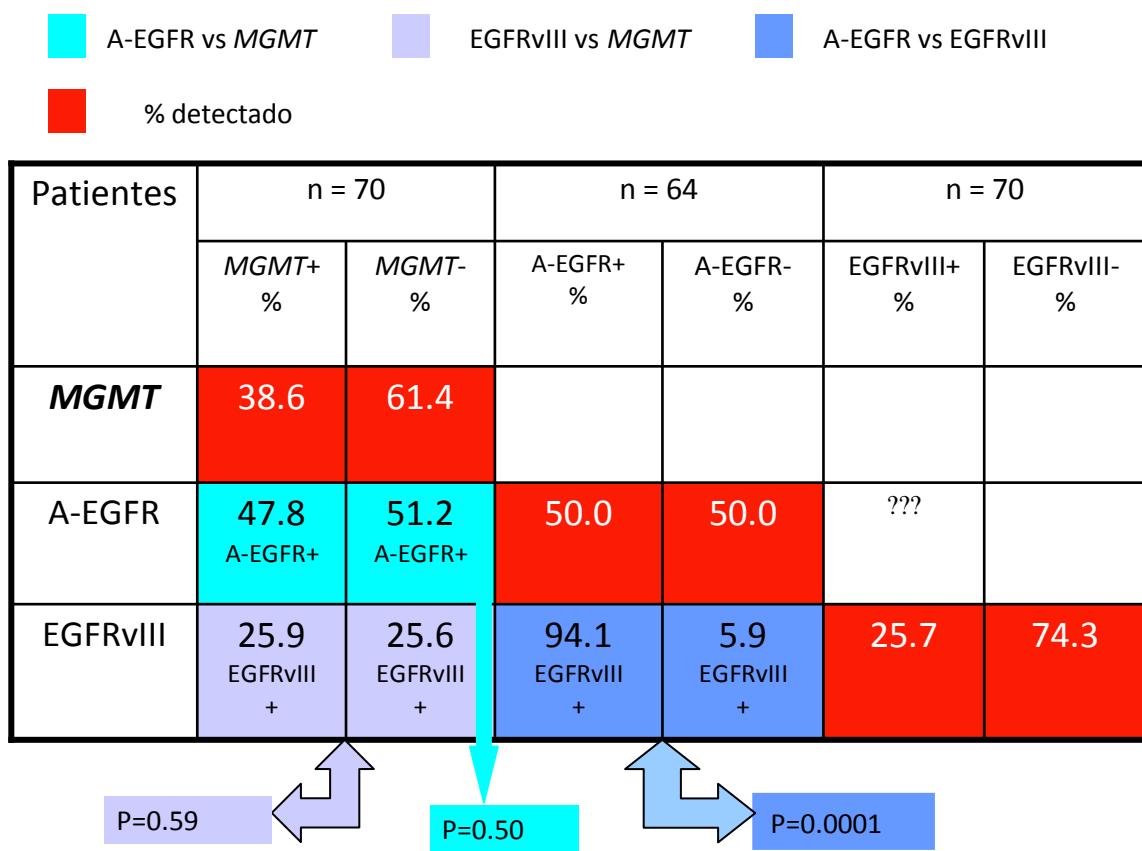
Tabla 1. Resumen de características de los pacientes . Total de pacientes :70
Pacientes Nº (%).

Resultados moleculares

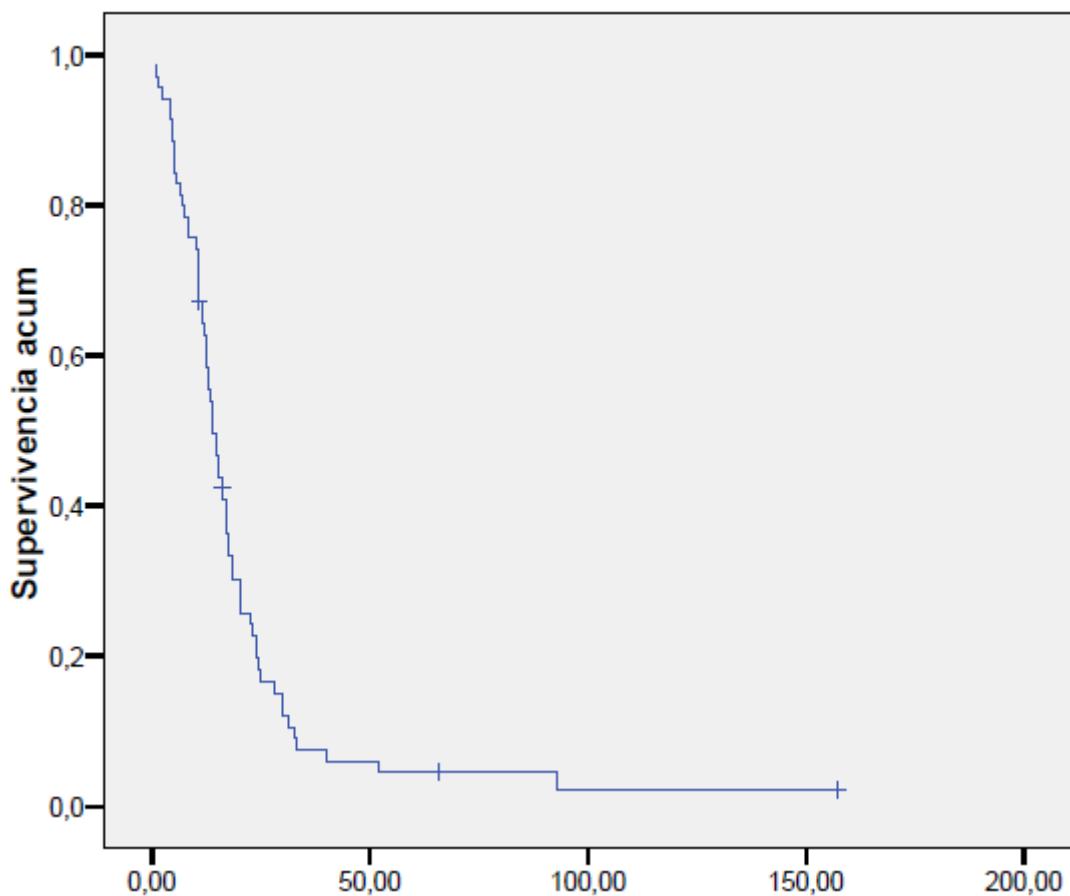
Metilación MGMT N= 70		Amplificación EGFR N= 63		EGFRvIII N= 70	
Sí	No	No	Sí	Sí	No
38.6%	61.4%	50%	50%	25.7%	74.3%

Al intentar asociar los diferentes análisis genéticos se observó que el estado de metilación del MGMT no estaba relacionado con la amplificación del EGFR ($p=0,50$) ni con la variante EGFR vIII ($p=0.59$).

Por otro lado, la mayoría de los que presentaban la mutación EGFR vIII (94,1%), presentaban la amplificación del EGFR ($p= 0.0001$) y a la inversa.



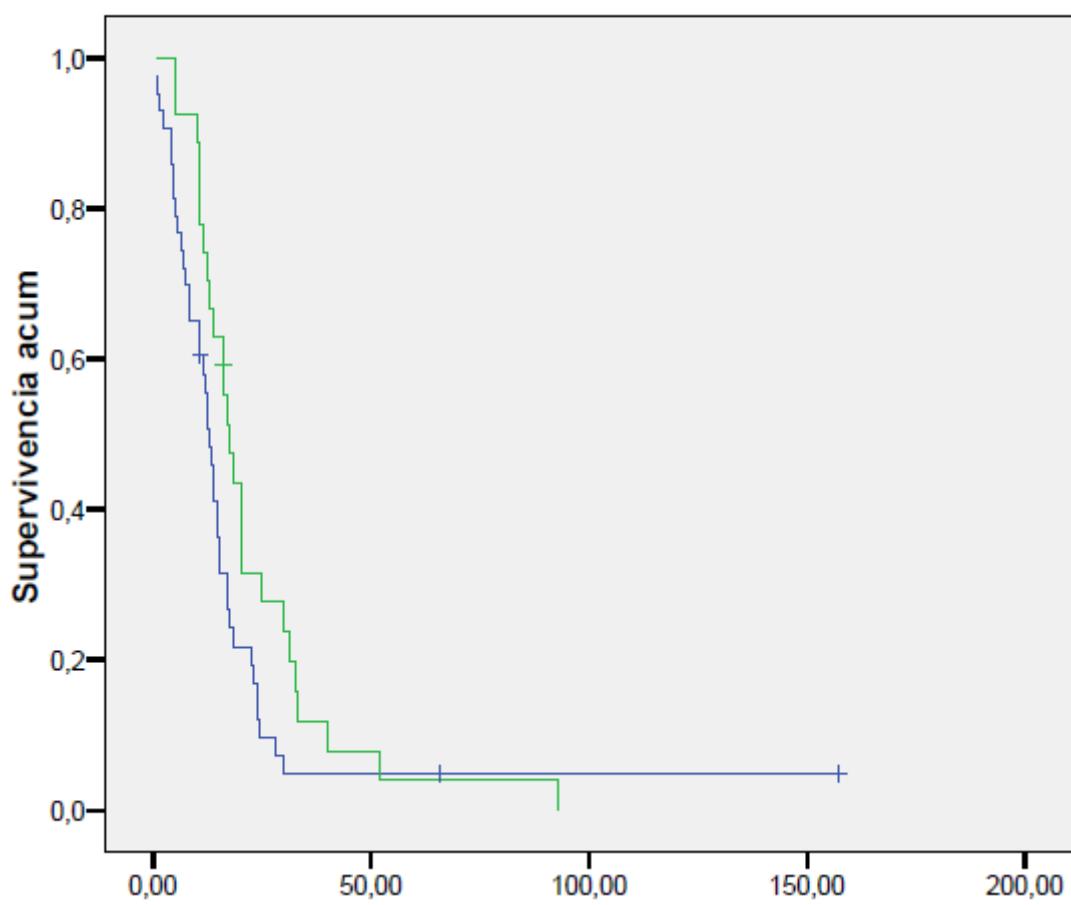
SUPERVIVENCIA GLOBAL



Mediana			
Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
13,878	1,173	11,579	16,176

La supervivencia global (SG) se estimó en 13,8 meses en todos los pacientes.

SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGUN ESTADO DE MGMT

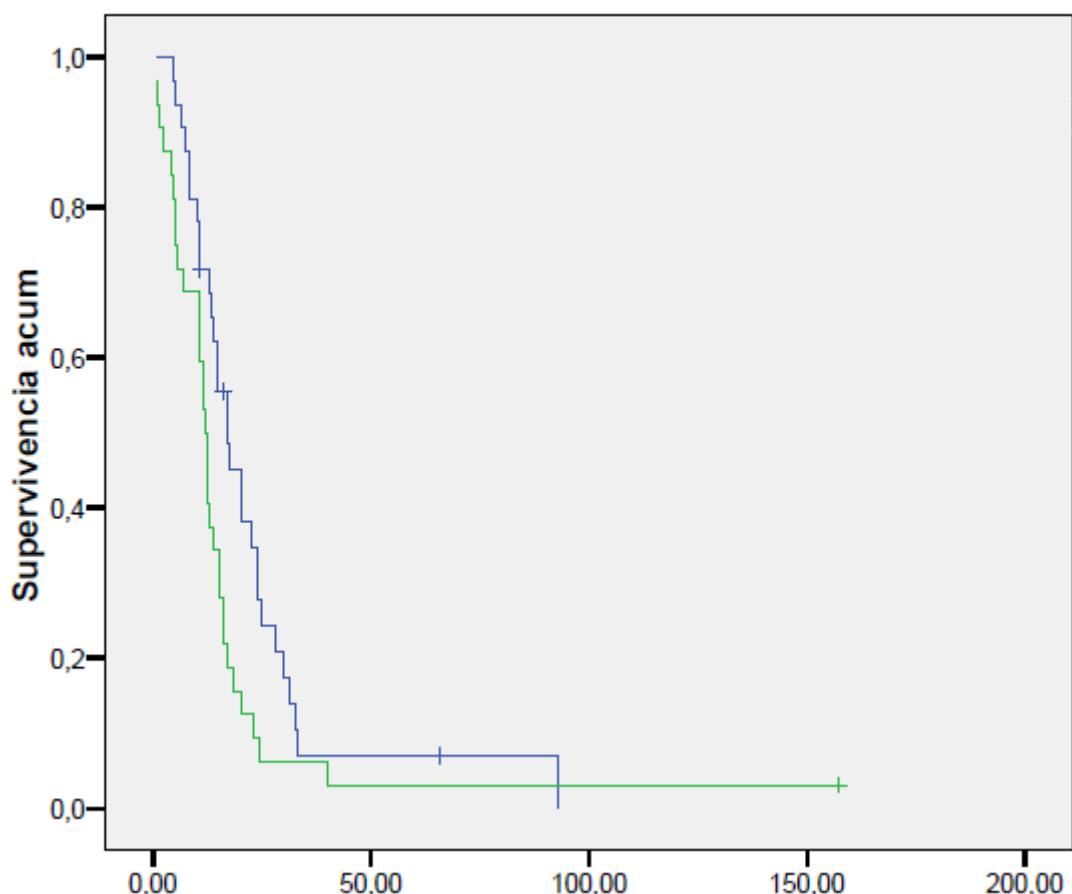


Azul : no metilado Verde : metilado

tissue MGMT	Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
not methylated	13,027	1,231	10,614	15,440
methylated	17,381	1,899	13,659	21,103
Global	13,878	1,173	11,579	16,176

Tras haber realizado en los 70 pacientes el estudio de la metilación del gen *MGMT*, ésta fue detectada en un 38,6% (27 de 70 pacientes) y en cambio en su mayoría (61,4%) el gen se encontraba intacto. Se demostró que el estado de metilación del *MGMT* estaba relacionado con la SG siendo superior en los pacientes metilados (*MGMT+*) con una SG de 17,3 meses y de 13,02 meses en los pacientes no metilados (*MGMT -*) con una diferencia no significativa ($p= 0.072$) a favor de la metilación del *MGMT*.

SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGUN AMPLIFICACION EGFR



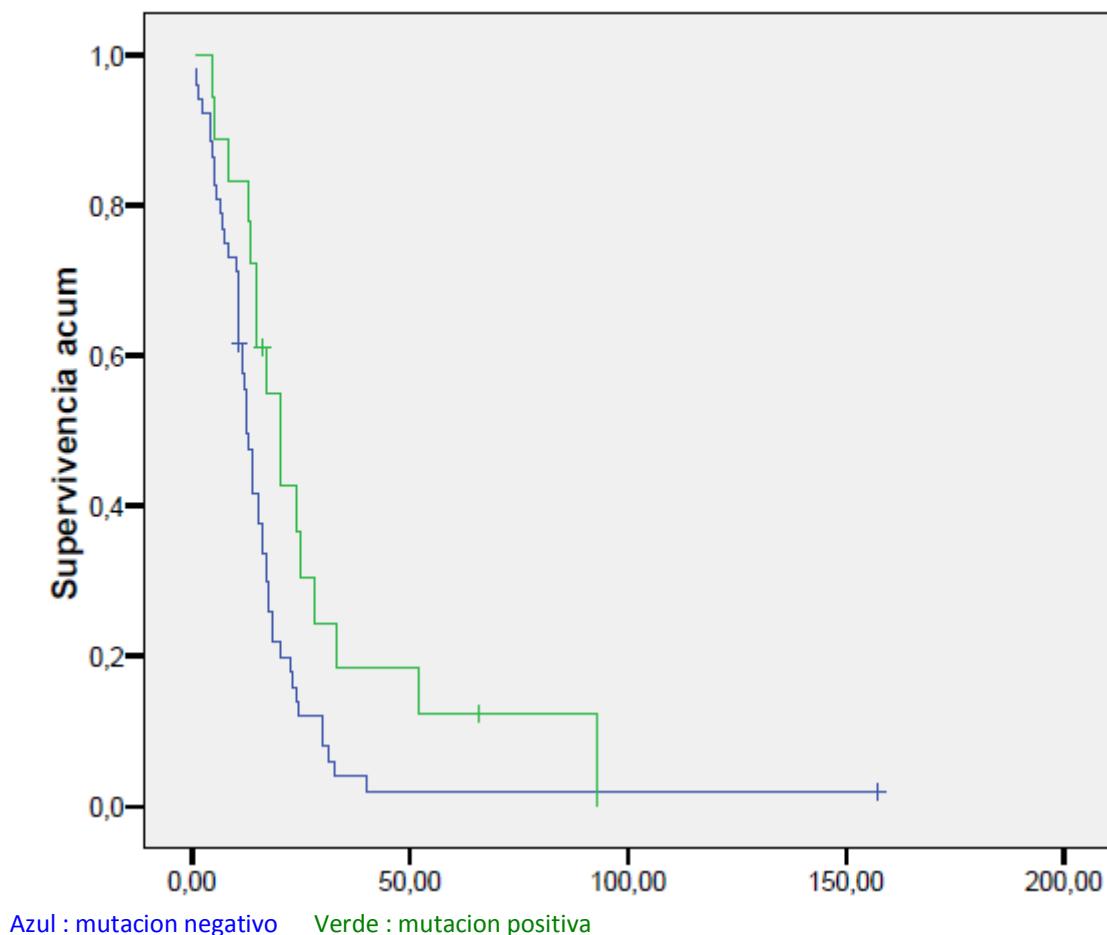
Azul : amplificado Verde : no amplificado

EGFR RESULTADO	Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
AMPLIFICADO	17,279	3,584	10,255	24,303
NORMAL	11,871	,625	10,645	13,096
Global	13,639	1,221	11,245	16,033

El estudio de la amplificación del EGFR se realizó en 64 de los 70 pacientes (debido a que 6 muestras no fueron evaluables), de los cuales la mitad (32/64) presentaban la amplificación de este receptor tirosina kinasa.

En el caso de los pacientes que presentaban la amplificación del EGFR se objetivó una SG mayor (17,2 meses) comparado con aquellos que no lo presentaban (11,8 meses) con una diferencia significativa (p= 0.030).

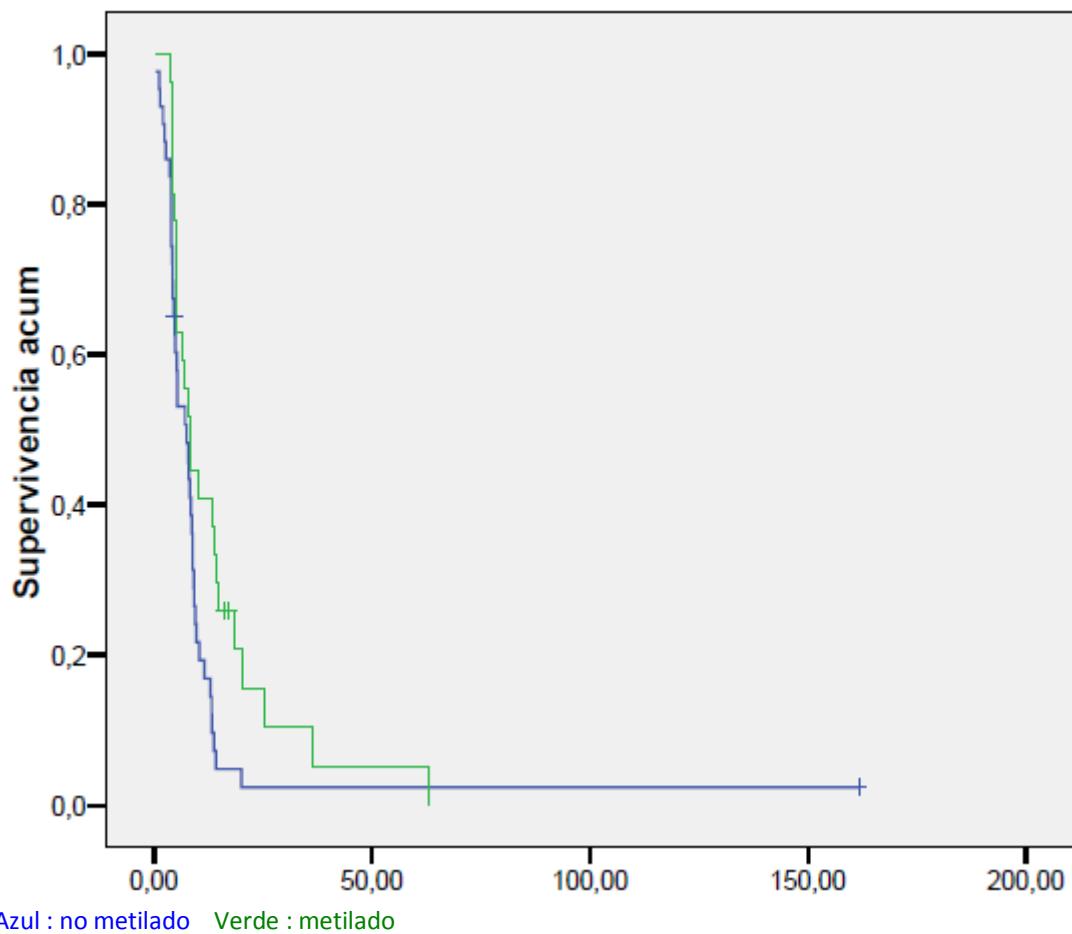
SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGUN EGFRvIII



MUTACION EGFRvIII	Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
negativo	12,585	1,136	10,359	14,811
positivo	20,170	2,941	14,405	25,935
Global	13,878	1,173	11,579	16,176

El estudio del EGFRvIII se realizó en todos los pacientes (70p) y se detectó en un 25,7% (18/70). Los pacientes que presentaban la mutación EGFR vIII se relacionaron con una mayor SG (20,1 meses) comparado con aquellos con una mutación negativa del mismo (12,5 meses) de forma significativa (p= 0,025).

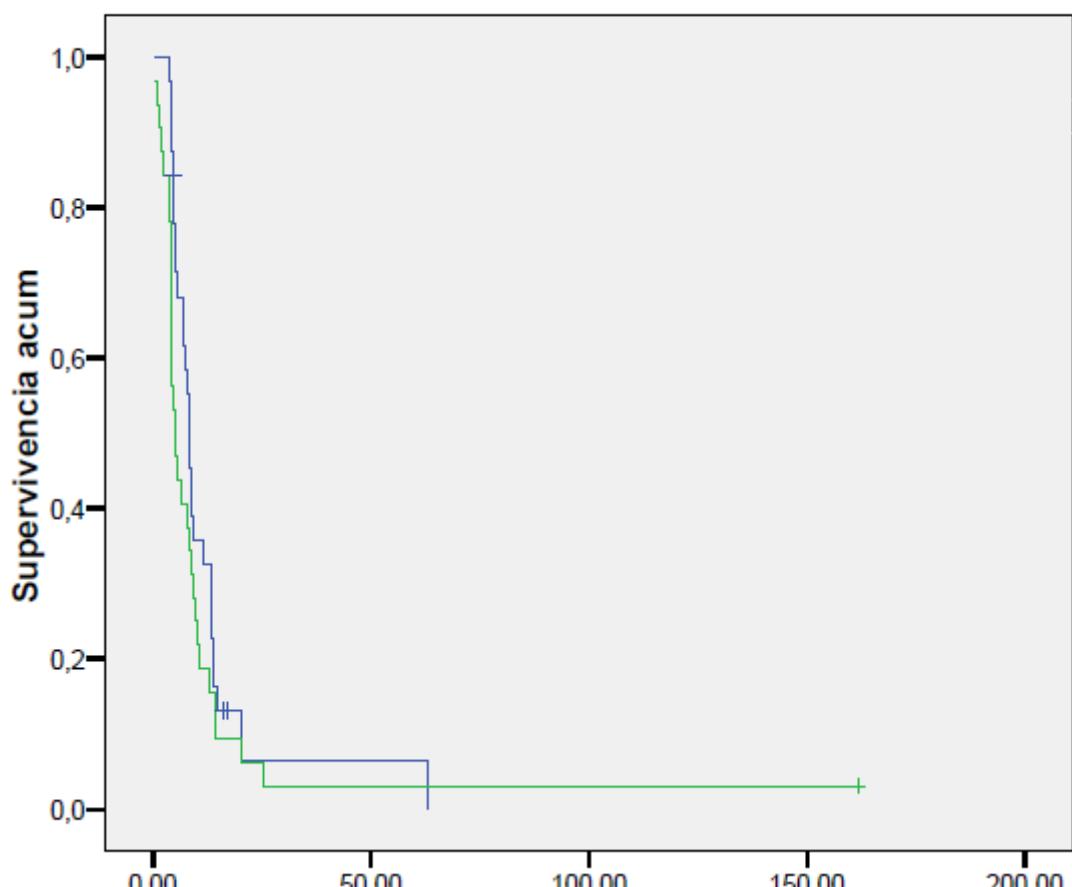
TIEMPO A LA PROGRESION (TP) SEGUN METILACION MGMT



tissue MGMT	Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
not methylated	7,483	1,649	4,252	10,714
methylated	8,163	1,060	6,086	10,240
Global	7,823	,826	6,204	9,442

El TP fue de 8,1 meses en el caso de los pacientes MGMT+ y de 7,4 meses en el caso de los pacientes MGMT- con una superioridad a favor de los MGMT+ de forma significativa (p= 0.038).

TIEMPO A LA PROGRESIÓN SEGUN FISH EGFR

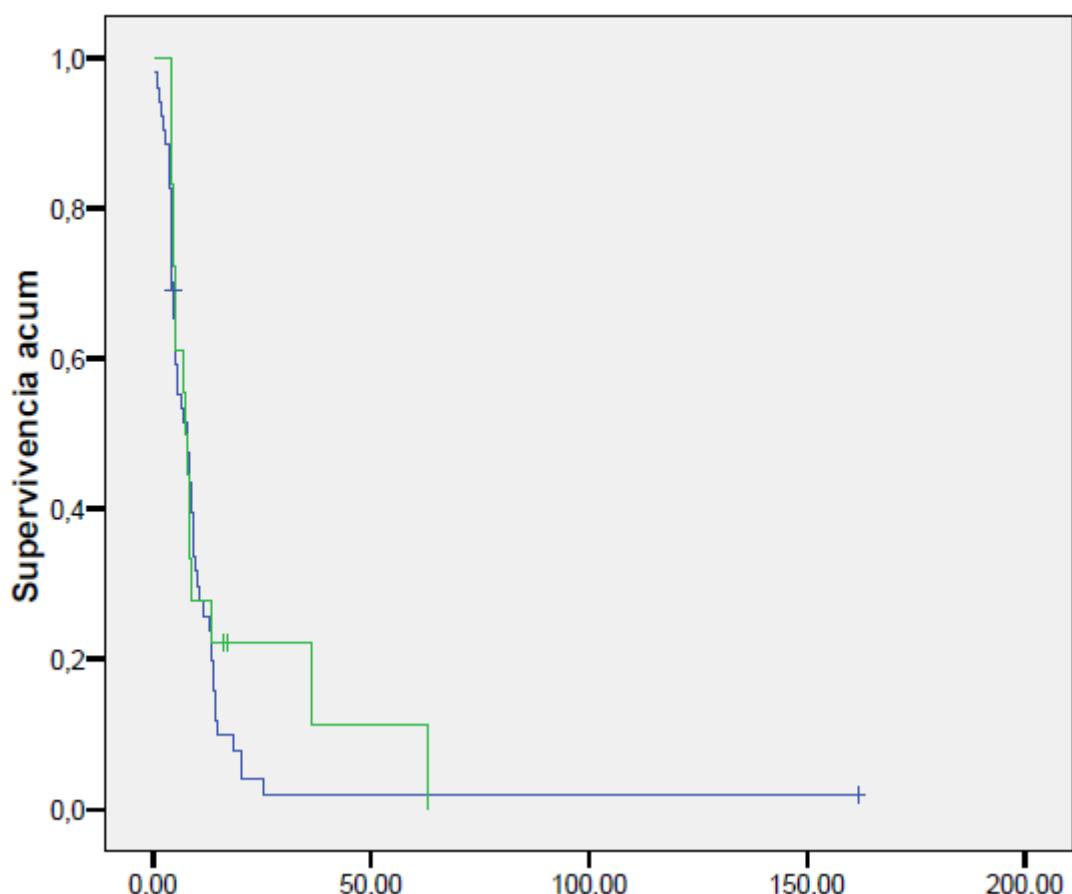


Azul :amplificado Verde : normal

EGFR RESULTADO	Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
AMPLIFICADO	8,231	,611	7,033	9,430
NORMAL	5,170	,696	3,806	6,534
Global	7,483	1,550	4,446	10,520

Tras haber analizado la presencia o no de la amplificación del EGFR en un total de 64 pacientes , se objetivó un TP de 8,2 meses en los amplificados a diferencia de 5,1 meses en el caso de los no amplificados . Pero aunque se observó una superioridad en términos de TP a favor de los pacientes que presentaron la amplificación , ésta no fue significativa (p= 0,194).

TIEMPO A LA PROGRESION SEGUN EGFR VIII



Azul : negativo Verde : positivo

MUTACION EGFRvIII	Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
negativo	7,823	1,663	4,565	11,082
positivo	7,483	,866	5,786	9,180
Global	7,823	,826	6,204	9,442

Analizando la presencia o no de la mutación del EGFR viii en el total de 70 pacientes , se objetivó un TP de 7,4 meses en los EGFR viii positivos y de 7,8 meses en el caso de los EGFRvIII negativos , sin diferencia significativa entre los dos grupos (p= 0.386) .

ANALISIS MULTIVARIANTE

El análisis multivariante se realizó en un total de 63 pacientes , pués el análisis de la amplificación del EGFR no se pudo llevar a cabo en todos los pacientes (n=70). Ésta es la tabla que resume las variables incluidas en el mismo. Más adelante se presentan las tablas de SG y TP .

VARIABLES	VALOR	SIGNIFICADO	FRECUENCIA
Radioterapia	0	No realizado o < 40 Gy	4
	1	Realizado a > 60Gy	59
MGMT tisular	0	No metilado	40
	1	Metilado	23
EGFRvIII	0	Negativo	46
	1	Positivo	17
Edad	0	>/= 50años	56
	1	< 50 años	7
ECOG	0	< 70% IK	7
	1	> /= 70% IK	56
Base quimio	0	TMZ	36
	1	BCNU	27
Cirugía	0	Biopsia	7
	1	Resección	56
FISHCOX	0	No amplificado	31
	1	Amplificado	32

TABLA DE ANALISIS MULTIVARIANTE DE SUPERVIVENCIA GLOBAL

VARIABLES	SIGNIFICANCIA	HAZARD RATIO	IC 95%	
			LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
Edad <50a	0.040	2.734	1.048	7.134
Radioterapia	0.000	27.034	6.252	116.901
MGMT tisular	0.036	1.956	1.403	3.668
IK >70 %	0.905	1.072	0.342	3.358
Cirugía	0.676	1.277	0.405	4.032
Base de quimio	0.496	1.218	0.690	2.152
FISHCOX	0.089	1.803	0.915	3.556
EGFRvIII	0.526	1.267	0.610	2.633

Tras haber realizado el análisis multivariante de la SG, se concluyó que las variables edad , radioterapia y estado de metilación tisular eran factores pronósticos de supervivencia con una significancia estadística. En definitiva , los pacientes de menos de 50 años , metilados y tratados mediante radioterapia eran los que presentaban mayor supervivencia global .

TABLA DE ANALISIS MULTIVARIANTE DE TIEMPO A LA PROGRESION

VARIABLES	SIGNIFICANCIA	HAZARD RATIO	IC 95%	
			LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
Edad < 50a	0.040	2.845	1.049	7.715
Radioterapia	0.000	10.398	2.861	37.793
MGMT tisular	0.020	2.204	1.133	4.288
IK > 70%	0.227	1.863	0.679	5.108
Cirugía	0.165	2.117	0.735	6.098
FISHCOX	0.171	1.625	0.810	3.257
EGFRvIII	0.289	0.662	0.309	1.419
Base de quimio	0.126	0.641	0.363	1.132

En el análisis multivariante del TP se observó , al igual que en el análisis anterior , que la edad , radioterapia y la metilación tisular eran factores pronósticos de TP de forma significativa .

6.- DISCUSION

El glioblastoma es el tumor más frecuente del sistema nervioso central. Constituye el 15% de las neoplasias intracraneales y el 50 – 60% de los tumores astrocíticos.

Aunque el pronóstico del GB es pobre en general , un subgrupo de pacientes pueden presentar una supervivencia mayor de 5 años , en relación a factores clínicos pronósticos como la edad , performance status(PS) , Minimental test y extensión de la cirugía (clasificación clínica RPA) y factores moleculares como el estado de metilación del enzima MGMT , el cuál está en relación con la quimiosensibilidad a agentes alquilantes y la supervivencia global .

Por lo tanto , éstos factores podrá ayudar a identificar éste subgrupo de pacientes largos supervivientes .

Mientras unos factores han demostrado ser factores pronósticos de supervivencia, otros están siendo investigados .

A pesar de que el GB es frecuente que presente amplificación o sobre expresión del EGFR , su valor pronóstico es controvertido. Existen autores que postulan la falta de valor pronóstico en términos de supervivencia global (SG). Por otro lado un metanálisis sobre estudios publicados para determinar el posible valor pronóstico de la amplificación del gen EGFR en GB , objetivó un riesgo relativo de muerte a 1 año desde el diagnóstico en relación a pacientes con o sin la amplificación de 1.13 con un intervalo de confianza de del 95% de 0.71-1.8, el cual no era estadísticamente significativo .

En el actual estudio , la amplificación del EGFR se ha detectado en la mitad de un total de 64 pacientes con una diferencia significativa en cuanto a SG en los pacientes con la amplificación del EGFR respecto a los que no la presentan , en cambio en términos de TP (tiempo a la progresión) la diferencia no es significativa . Por otro lado en el análisis multivariante, al enfrentarlo a factores clínicos perdieron su significancia , al igual que en la literatura.

Los resultados del análisis univariante del EGFRvIII , detectado en un 25,7% del total de 70 pacientes (similar a la literatura) , ha demostrado significancia estadística en cuanto a SG , no en cambio en TP , mientras que en el análisis multivariante tampoco se ha demostrado su posible valor pronóstico.

Estos resultados quizá deban a la relación que existe entre ellos, dado que se asocian en un 94,1%.

En cambio no se ha podido demostrar asociación entre el estado de metilación del MGMT y la amplificación o mutación del EGFR.

En el estudio actual , según el análisis multivariante , las variables con valor pronóstico ,en términos de supervivencia global y tiempo a la progresión, se han concluido que son la edad , la radioterapia y el estado de metilación del MGMT.

La edad joven (< 50 años) y la administración de una radioterapia óptima (dosis total 60 Gy) ya están definidos como factores pronósticos en la literatura, y así también se concluyen en el actual estudio.

El estado de metilación del enzima MGMT se confirma como factor pronóstico independiente en cuanto a SG y TP en el análisis multivariante, al igual que en el análisis univariante del TP , pero no en cambio en el análisis univariante de la SG.

En cambio en cuanto al resto de las variables moleculares , tanto la amplificación del EGFR y la detección de EGFR vIII , ajustados a variables clínicas pierden su posible valor pronóstico. Por lo que podríamos concluir que no se tratan de factores necesarios para la planificación terapéutica pero son importantes de cara al estudio de nuevos fármacos como terapias diana .

7.- CONCLUSIONES

- # La mayoría (94,1%) de los que presentaron la mutación EGFRvIII expresaban la amplificación , por lo que se demostró asociación entre los mismos .
- # No se demostró asociación entre el estado de metilación MGMT y la mutación o amplificación del EGFR .
- # En el análisis univariante de supervivencia global (SG) , las variables moleculares que demostraron significancia fueron la amplificación del EGFR y la mutación EGFRvIII (p=0,030 y p=0,025 , respectivamente) .
- # En el análisis univariante del tiempo a la progresión (TP) , la variable molecular que demostró significancia fue la metilación del MGMT (p=0,038).
- # Tanto en el análisis multivariante de SG y de TP , las variables que demostraron diferencia significativa fueron la edad menor a 50 años , la realización de radioterapia y la metilación del MGMT (p< 0,05) .
- # Tanto la amplificación del EGFR y la mutación EGFRvIII no se consideran factores pronósticos , a diferencia de la metilación del MGMT que se podría considerar factor predictivo de respuesta y factor pronóstico en pacientes tratados con radioterapia y quimioterapia basada en alquilantes.

8.- BIBLIOGRAFIA

- [1] Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, et al. The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Ann Neurol.* 1995;37:67-73.
- [2] Burger PC, Green SB. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer.* 1987;59:1617-1625.
- [3] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O, et al. The WHO classification of tumours of the central nervous system . *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109.
- [4] Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta Gecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;67:139-152.
- [5] Simpson JR, Horton J, Scott C, et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiform: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:239-44.
- [6] Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolamide for glioblastoma . *N Engl J Med.* 2005;352:987-996.
- [7] National comprehensive cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology : central nervous system cancers(V.1.2008).
- [8] Westphal M, Hilt DC, Bortey E, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol.* 2003;5:79-88.

- [9] Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncol.* 1999;1:44-51.
- [10] Tso CI, Frieja WA, Day A, et al. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res.* 2006;66:159-167.
- [11] Biernat W, Thoma Y, yonekawa Y, et al. Alteractions of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and seconadry glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl).* 1997;94:303-309.
- [12] Watanabe K, Tachibana O, Sato K, et al. Overexpression of the EGFR receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 1996;6:217-223.
- [13] Tohma Y, Gratas C, Biernat W, et al. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57:684-689.
- [14] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes dev.* 2007;21:2683-2710.
- [15] Paul Kleihues,Hiroko Ohgaki. Primary and secondary glioblastomas : From concept to clinical diagnosis. *Neuroncology.* 1999, Jan 44-59.
- [16] René-Olivier Mirimanoff, Thierry Gorlia. Radiotherapy and Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: Recursive Partitioning Analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 Phase III Randomized Trial. *JCO.* 2006, 4;2563-69.
- [17] Jaeckle KA, Eyre HJ, Townsend JJ, et al. Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patientes treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 1998, 16:3310-3315.

- [18] Hegi ME, Lui L, Herman JG, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT. *J Clin Oncol.* 2008;26:4189-4199.
- [19] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:997-1003.
- [20] Reardon DA, Wen PY. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist.* 2006;11:152-164.
- [21] Christopher E, Karla V. Epidermal growth factor receptor variant III status Defines clinically distinct subtypes of Glioblastoma . *JCO* .2007 ; 25: 2288-2294.
- [22] Ingo K, Mellinghoff M.D. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *NEJM.* 2005, 10: 353-99.
- [23] Amy B.Heimberger, Roman Hlatky. Prognostic Effect of Epidermal Growth Factor Receptor and EGFRvIII in Glioblastoma Multiforme Patients. *Clinical Cancer Research.* 2005, 11;1462:66.
- [24] Arnab Chakrvavarti,M.D, Adam Dicker,M.D. The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signalling pathway to radioresistance in human gliomas: a review of preclinical and correlative clinical data. *Int J.Radiation Oncology Biol Phys.* 2004, 58; 927-31.
- [25] Huhn SL, Mohapatra G. Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme by comparative genomic hybridization: correlation with radiation treatment outcome. *Clin Cancer Research .* 1999, 5: 1435-33.

- [26] Phillips ,H. et al. Molecular subclasses of high -grade glioma predict prognosis , delineate a pattern of disease progression, and resemple stages in neurogénésis. *Cancer Cell* . 2006, 9;157-173.
- [27] Verhaak,R.G.et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH-1, EGFR, and NF1.*Cancer cell* . 2009, 17; 98:110.
- [[28] Jason T.Huse, Eric C. Holland. Targeting brain cancer : advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature Reviews*. 2010, 10;319-331.
- [29] The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008; 455(7216):1061-1068.
- [30] Markus J.Riemenschneider ,et al. Molecular diagnostics of gliomas : state of the art. *Acta Neuropathol*. 2010.