



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *MGMT*,
EN MUESTRAS DE TEJIDO Y SANGRE DE PACIENTES CON
GLIOBLASTOMA, MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN**

Anna Estival González



Tesis Doctoral
Barcelona, 2019



PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *MGMT*,
EN MUESTRAS DE TEJIDO Y SANGRE DE PACIENTES CON
GLIOBLASTOMA, MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN**

Tesis doctoral presentada por
Anna Estival González
para optar al grado de **Doctora**, por la Universidad Autónoma de Barcelona

Doctoranda Directora Directora Tutor

Anna Estival M Carmen Carolina Sanz Evarist Feliu
González Balañá Quintero Monte Frasnado

Barcelona, 2019

**ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *MGMT*,
EN MUESTRAS DE TEJIDO Y SANGRE DE PACIENTES CON
GLIOBLASTOMA, MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN**

Anna Estival González

Este trabajo se ha realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, conjuntamente con el Departamento de Oncología Médica del ICO (Institut Català d'Oncologia) Badalona, bajo la dirección de las Dras. M. Carmen Balañá Quintero (Servicio de Oncología Médica) y Carolina Sanz Monte (Servicio de Anatomía Patológica) y el tutor Evarist Feliu Frasedo.

Barcelona, 2019

AGRADECIMIENTOS

Todas las personas, que han dedicado un poco de su tiempo a mi formación como profesional, y a mi crecimiento personal, merecen ser mencionadas aquí. Así que, a todas ellas, muchas gracias por haber aportado vuestro granito de arena.

Quiero agradecer, de manera especial, a mis directoras, una combinación perfecta sin la cual este proyecto no hubiera sido posible.

A la Dra. Balaña, una persona decisiva en mi carrera, porque confió en mí desde el primer día en que me conoció. Por ser una gran compañera, por su accesibilidad, su espontaneidad, su energía y su mente maravillosa.

A la Dra. Sanz, por su actitud siempre positiva, su dedicación enseñando a pipetear a una oncóloga y por intentar contagiarme un poco de su perseverancia de bióloga.

Gracias, también al Dr. Feliu, por ser un gran docente y por transmitirme un poco de su sabiduría.

Muchas gracias a mis compañeros, por compartir el día a día. En particular, gracias al equipo A, un equipo al que me siento orgullosa de pertenecer, y a Montse, por la confianza, por el compañerismo y por el cariño que hacen que los días estresantes sean un poco más bonitos.

Gracias a todo el equipo de biología molecular y de patología del Hospital Universitari y del Institut Germans Trias i Pujol, por recibirme con los brazos abiertos y tener una excelente predisposición para compartir laboratorio con una novata. Especialmente, gracias a Pepe Ramírez y a Cristina Carrato, por su contribución en esta tesis.

A todos y cada uno de los componentes de la unidad de neuro-oncología, y a los compañeros de otros servicios, con los que trabajo a diario. Gracias por la colaboración y el trabajo en equipo.

También quiero agradecer, con mucho afecto, a los pacientes, mi razón para ser oncóloga.

A mis amigos, en especial a mis compañeros de carrera, por ser mi segunda familia, y demostrar que “la distancia” no se mide por kilómetros. Gracias por estar siempre ahí.

Y, por último, a mi familia. La de aquí y la de ahí. Por la infinita paciencia, por el apoyo y porque sin ellos no hubiera cumplido mi sueño de ser médico y oncóloga.

Dedicado a Alberto, mi compañero de aventuras

ABREVIATURAS

2-HG: D-2-hidroxiglutarato.

5-ALA: Ácido-5- aminolevulínico.

α -KG: α -cetoglutarato.

A: Adenina.

AA: Astrocitoma anaplásico.

ACNU: Nimustina.

ADC: Coeficiente de difusión aparente (del inglés, *apparent diffusion coefficient*).

AINEs: Anti-inflamatorios no esteroideos.

AKT: Serina/ treonina quinasa.

APC: Poliposis adenomatosa del colon (del inglés, *adenomatous polyposis coli*) (gen).

APS: Adenosina -5- fosfosulfato.

ATP: Adenosina trifosfato.

ATRX: Gen del síndrome de la α -talasemia y retraso mental ligado a X (del inglés, *α -thalassemia/mental retardation-syndrome-X-linked*) (gen).

ATRX: Proteína codificada por el gen ATRX.

BCNU: Carmustina.

Bev: Bevacizumab.

BHE: Barrera hemato-encefálica.

BRCA 1: Cáncer de mama 1 (del inglés, *breast cancer 1*) (gen).

C: Citosina.

CA 125: Antígeno de cáncer 125.

CCNU: Lomustina.

CD 45: Antígeno común leucocitario.

CDK: Quinasa dependiente de ciclina (del inglés, *cyclin dependent kinase*).

CDKN2A: Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (del inglés, *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*).

CEA: Antígeno carcinoembrionario.

CG: Citosina – Guanina.

cIMPACT-NOW: Consorcio para informar sobre los enfoques moleculares y prácticos para la taxonomía de los tumores del SNC (del inglés, *The Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy*).

Cho: Colina.

CLS: clásico.

CO₂: Dióxido de carbono.

CTCs: Células circulantes tumorales (del inglés, *circulating tumor cells*).

ctDNA: DNA tumoral circulante (del inglés, *circulating tumor DNA*).

CpG: Citosina - fosfato - guanina.

Cr: Creatina.

d: días.

DAPK: Proteína quinasa asociada a muerte celular (del inglés, *death-associated protein kinase*).

DNA: Ácido desoxirribonucleico (del inglés, *deoxyribonucleic acid*).

DNET: Tumor disembrionoplástico neuroepitelial (del inglés, *dysembryoplastic neuroepithelial tumour*).

DNMT: DNA metiltransferasa.

dNTP: Desoxirribonucleido trifosfato.

DOPA: 3,4-dihidroxi-6-¹⁸F-fluoro-L-fenilalanina.

E.coli: *Escherichia coli*.

ECOG: Grupo cooperativo del Este (del inglés, *Eastern Cooperative Group*).

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EE: Enfermedad estable.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *epidermal growth factor receptor*).

EMR: Enfermedad mínima residual.

EORTC: Organización europea para la investigación y tratamiento del cáncer (del inglés, *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*).

EpCAM: Molécula de adhesión celular epitelial (del inglés, *epithelial cell adhesion molecule*).

ERBB2: HER2, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (del inglés, *human epidermal growth factor receptor 2*) (gen).

ESR1: Receptor 1 de estrógeno (del inglés, *estrogen receptor 1*) (gen).

FDG: ¹⁸F-2-fluoro-2-deoxi-D-glucosa.

FET: O-2-¹⁸F-fluoroetil-L-tirosina.

FFPE: Muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (del inglés, *formalin-fixed paraffin-embedded*).

FISH: Hibridación in situ fluorescente (del inglés, *fluorescence in situ hybridization*).

FLAIR: Recuperación de inversión atenuada de fluido (del inglés, *fluid-attenuated inversion recovery*).

FGFR2: Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés, *fibroblast growth factor receptor 2*) (gen).

G: Guanina.

G-CIMP: Fenotipo metilador de islas CpG en gliomas (del inglés, *glioma CpG island methylation phenotype*).

GB: Glioblastoma.

GB-IDHm: Glioblastoma con mutación de IDH.

GB-IDHwt: Glioblastoma sin mutación de IDH o IDH silvestre (del inglés, *IDH wild type*).

GEINO: Grupo español de investigación en neuro-oncología.

GENOM: Grupo español de neuro-oncología médica.

GFAP: Proteína glio-fibrilar ácida (del inglés, *glial fibrillary acidic protein*).

GSTP1: Glutación S-transferasa- P1 (del inglés, *glutathione S-transferase P1*).

Gy: Grays.

HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 alfa (del inglés, *hypoxia-inducible factor 1 alpha*).

HR: Cocientes de riesgo (del inglés, *hazard ratio*).

HRM: Análisis de alta resolución de fusión (del inglés, *high resolution melting*).

IC: Intervalo de confianza.

IDH1: Isocitrato deshidrogenasa 1 (gen).

IDH1: Proteína codificada por el gen *IDH1*.

IDH2: Isocitrato deshidrogenasa 2 (gen).

IDH2: Proteína codificada por el gen *IDH2*.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IK: Índice de Karnofsky.

IL-6: Interleuquina-6.

iRANO: Valoración de respuesta a la inmunoterapia en neuro-oncología (del inglés, *immunotherapy response assessment in neuro-oncology*).

Kg: Kilogramo.

LCR: Líquido céfalo-raquídeo.

LMA: Leucemia mieloide aguda.

LOH: Pérdida de heterocigosidad (del inglés, *loss of heterogeneity*).

m: meses.

MBP: Proteína básica de la mielina (del inglés, *myelin basic protein*).

MDM2: Doble minuto murina 2 (del inglés, *murine double minute 2*) (proteína).

MET: Metilado. Metilación del promotor de *MGMT* positiva.

MET: Factor de transición epitelio-mesénquima (del inglés, *mesenchymal-epithelial transition factor*) (gen).

Metionina: 11C-metil-metionina.

MES: mesenquimal (clasificación de Philips).

MES-TCGA: mesenquimal (clasificación del TCGA, Verhaak).

mg: miligramos.

MGMT: O6-Metilguanina-DNA-metiltransferasa (gen).

MGMT: Proteína codificada por el gen *MGMT*.

miRNA: micro RNA circulante (del inglés, *circulating micro RNA*).

MLH1: Gen homólogo humano 1 (del inglés, *mutL Homology 1*) (gen).

MMSE: Test de Minimental (del inglés, *Minimental Status Examination*).

M-MSP-S: Metilación en sangre, mediante MSP.

M-MSP-T: Metilación en tejido, mediante MSP.

MMP-9: Metaloproteinasa de matriz-9 (del inglés, *matrix metalloproteinase-9*).

M-PIR-P: Metilación en plasma, mediante pirosecuenciación.

M-PIR-Su: Metilación en suero, mediante pirosecuenciación.

M-PIR-T: Metilación en tejido, mediante pirosecuenciación.

mRNA: RNA mensajero (del inglés, *messenger ribonucleic acid*).

MS-HRM: Análisis metilación-específica de fusión de alta resolución (del inglés, *methylation-sensitive high resolution melting*).

MS-MLPA: Amplificación dependiente de ligando específica de metilación (del inglés, *methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*).

MSP: PCR específica de metilación (del inglés, *methylation-specific PCR*).

m-TOR: Proteína diana de la rapamicina en mamíferos (del inglés, *mammalian target of rapamycin*).

N: número de pacientes.

NAA: N-acetil aspartato.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (del inglés, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*).

NCIC: Instituto Nacional de Cáncer de Canadá (del inglés, *National Cancer Institute of Canada*).

NEU: Neural.

NFκβ: Factor nuclear κβ (del inglés, *nuclear factor κβ*).

NF1: Neurofibromatosis tipo 1 (gen).

No-MET: No metilado. Metilación del promotor de *MGMT* negativa.

NOS: No especificado (del inglés, *not otherwise specified*).

OA: Oligoastrocitoma.

OAI: Oligoastrocitoma anaplásico (grado III de malignidad de la OMS).

OD: Oligodendroglioma.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

p: valor p.

p14^{ARF}: proteína supresora de tumores, codificada por *CDKN2A*.

p53: Proteína codificada por el gen *TP53*.

Pb: Pares de bases.

Pc: Pacientes.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*).

PDGFR α : Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas alfa (del inglés, *platelet derived growth factor receptor alpha*) (gen).

PDPN: Podoplanina.

PE: Progresión de enfermedad.

PET: Tomografía por emisión de positrones (del inglés, *positron emission tomography*).

PET-FDG: Tomografía por emisión de positrones (del inglés, *positron emission tomography*) con ¹⁸F-2-fluoro-2-deoxi-D-glucosa.

PI3K: Fosfatidil-inositol-3-quinasa (del inglés, *phosphatidylinositol-3-kinase*).

PM: Peso molecular.

PNET: Tumor neuroectodérmico primitivo (del inglés, *primitive neuroectodermal tumor*).

PPI: Pirofosfato.

PRL: Proliferativo.

PRN: Proneural (clasificación de Philips).

PRN-TCGA: Proneural (clasificación del TCGA, Verhaak).

PS: Estado funcional (del inglés, *Performance Status*).

PSA: Antígeno específico prostático (del inglés, *prostate-specific antigen*).

PsP: Pseudoprogresión.

PsR: Pseudorespuesta.

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (del inglés, *phosphatase and tensin homolog*) (gen).

PTEN: Proteína codificada por el gen *PTEN*.

QT: Quimioterapia.

QTRT: Quimio-radioterapia.

RANO: Valoración de respuesta en neuro-oncología (del inglés, *response assessment in neuro-oncology*).

RAR β : Receptor del ácido retinoico beta (del inglés, *retinoic acid receptor beta*).

RAS: Proteína del sarcoma de rata (del inglés, *rat sarcoma*).

RASSF1: Familia del dominio de asociación Ras 1 (del inglés, *ras association domain family 1*).

RECIST: Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (del inglés, *response evaluation criteria in solid tumors*).

RB: Retinoblastoma (gen).

Rb: Proteína codificada por el gen *RB*.

RC: Respuesta completa.

rCBV: Volumen sanguíneo cerebral relativo (del inglés, *relative cerebral blood volume*).

RLU: Unidad de luz relativa (del inglés, *relative light unit*).

RM: Resonancia magnética.

RNA: Ácido ribonucleico (del inglés, *ribonucleic acid*).

RP: Respuesta parcial.

RPA: Análisis de particiones recursivas (del inglés, *recursive partitioning analysis*).

RT: Radioterapia.

RTQ: Receptor tirosina quinasa.

RTOG: Grupo de oncología radioterápica (del inglés, *Radiation Therapy Oncology Group*).

Sem: Semanas.

SG: Supervivencia global.

SLP: Supervivencia libre de progresión.

SNC: Sistema nervioso central.

SPSS: Paquete estadístico para las ciencias sociales (del inglés, *statistical package for the social sciences*).

SQ-MSP: PCR específica de metilación semicuantitativa (del inglés, *semi-quantitative methylation-specific PCR*).

SST: Tubo separador del suero (del inglés, *serum - separating tube*).

STIR: Secuencia de inversión-recuperación con tiempo corto de inversión (del inglés, *short T1 inversion recovery*).

SUV max: Valores de captación máximos estandarizados (del inglés, *maximum standardized uptake values*).

T: Timina.

TC: Tomografía computarizada.

TCGA: Atlas del genoma del cáncer (del inglés, *The Cancer Genome Atlas*).

TERT: Transcriptasa reversa de la telomerasa (del inglés, *telomerase reverse transcriptase*) (gen).

TERT: Proteína codificada por el gen *TERT*.

TGF β : Factor de crecimiento transformante β (del inglés, *transforming growth factor β*).

TMA: Micromatriz de tejido (del inglés, *tissue microarray*).

TMZ: Temozolomida.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α (del inglés, *tumor necrosis factor- α*).

TP53: Proteína tumoral 53 (del inglés, *tumor protein 53*) (gen).

TR: Tasa de respuesta.

TTFields: Campos eléctricos para el tratamiento de tumores.

U: Uracilo.

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés, *vascular endothelial growth factor*).

VHL: Von Hippel-Lindau (gen).

VHL: Proteína codificada por el gen *VHL*.

VPN: Valor predictivo negativo.

VPP: Valor predictivo positivo.

vs: Versus.

Wt: Silvestre (del inglés, *wild type*).

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	7
ABREVIATURAS.....	11
ÍNDICE.....	19
ABSTRACT.....	21
RESUMEN.....	23
1 INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 El Glioblastoma.....	27
1.1.1 Epidemiología y anatomía patológica.....	27
1.1.2 Características clínicas.....	31
1.1.3 Radiología.....	32
1.1.4 Factores pronósticos y predictivos.....	42
1.1.5 Tratamiento.....	46
1.1.6 Biología molecular.....	50
1.2 El fenómeno de la metilación en el cáncer.....	59
1.2.1 La metilación del gen <i>MGMT</i> y su implicación en el GB.....	64
1.2.2 Técnicas de detección de la metilación del promotor de <i>MGMT</i>	66
1.3 La biopsia líquida en gliomas.....	74
1.3.1 Células tumorales circulantes (CTCs).....	76
1.3.2 Vesículas extracelulares.....	77
1.3.3 Proteínas.....	78
1.3.4 microRNA circulante (miRNA).....	79
1.3.5 DNA tumoral circulante (ctDNA).....	80
2 CONTEXTO DE LA TESIS. EL ENSAYO GENOM 009.....	87
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	93
3.1 Hipótesis.....	93
3.2 Objetivos.....	94
3.2.1 Objetivo principal.....	94
3.2.1 Objetivos secundarios.....	94
4 METODOLOGÍA.....	97
4.1 Selección de casos. Pacientes y muestras.....	97
4.2 Análisis de metilación del promotor de <i>MGMT</i> mediante pirosecuenciación.....	98
4.2.1 Extracción del DNA.....	99
4.2.2 Conversión del DNA con bisulfito.....	100
4.2.3 Reacción de la cadena de polimerasa específica de metilación (MSP).....	101
4.2.4 Pirosecuenciación.....	102
4.3 Análisis estadístico.....	105

5	RESULTADOS	109
5.1	Características de los pacientes.....	109
5.2	Muestras	111
5.2.1	Muestras de tejido	112
5.2.2	Muestras de sangre.....	112
5.3	Determinación del punto de corte de la pirosecuenciación	113
5.3.1	Punto de corte técnico	113
5.3.2	Metilación en muestras no patológicas	113
5.3.3	Puntos de corte para las muestras de sangre y tejido	114
5.4	Análisis individual de las diferentes CpGs.....	116
5.5	Correlación entre los resultados con MSP y pirosecuenciación.....	120
5.5.1	Metilación del promotor de <i>MGMT</i> en tejido	120
5.5.2	Metilación del promotor de <i>MGMT</i> en sangre.....	122
5.6	Correlación entre los resultados en sangre y tejido	122
5.6.1	Metilación del promotor de <i>MGMT</i> por MSP.....	122
5.6.2	Metilación del promotor de <i>MGMT</i> por pirosecuenciación.....	123
5.7	Impacto pronóstico y predictivo de la metilación del promotor de <i>MGMT</i>	124
6	DISCUSIÓN.....	131
6.1	Población a estudio.....	132
6.2	La sangre como fuente de biomarcadores.....	132
6.3	Estudio del ctDNA como biomarcador en sangre.....	135
6.4	Elección de la pirosecuenciación	137
6.4.1	Selección de CpGs	144
6.4.2	Punto de corte	146
6.5	Limitaciones.....	151
6.6	Fortalezas	152
7	CONCLUSIONES	155
8	LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA.....	159
9	FINANCIACIÓN.....	160
10	BIBLIOGRAFÍA.....	163
11	ANEXOS.....	181
11.1	Anexo 1: Test neurocognitivo MMSE.....	181
11.2	Anexo 2: Índice de Barthel	182

ABSTRACT

Background: Glioblastoma (GB) is the most frequent malignant glioma. Through multidisciplinary treatment with surgery, radio and chemotherapy, patients with GB achieve a median survival of 15 months. Methyl Guanine Methyl Transferase (*MGMT*) promoter methylation is a known prognostic and predictive factor of response to temozolomide in these tumors. However, repeating *MGMT* analysis is not always feasible. Brain rebiopsies involve risk to the patient. Moreover, tissue biopsies could not always represent the tumor heterogeneity. Advances in the use of biomarkers in liquid biopsy are positioning it as a solution to these disadvantages. *MGMT* methylation status analysis can be carried out through several techniques, being the methylation-specific PCR (MSP) the most used, both in clinical trials and in daily practice. Pyrosequencing is a simple method with objective results that has proved useful for the analysis of this epigenetic alteration.

In this project, we have determined the *MGMT* promoter methylation status, in tissue samples and in ctDNA from blood samples of GB patients, by MSP and pyrosequencing.

Methodology: *MGMT* methylation was analyzed in tissue and blood from patients diagnosed with GB. We used MSP (CpG 74-78 and 84-87) in 81 tissue samples and 83 blood samples, and pyrosequencing (CpG 74-78) in 78 tissue, 56 serum and 55 plasma samples. For pyrosequencing, two cut-off points with clinical relevance were considered: one that divided the cohort into two groups according to the maximum difference in overall survival, called "best cut-off point", and the minimum percentage from which the methylation had already a clinical impact, called the "minimum cut-off point". Both cut-off points were statistical significant.

Results: The "best cut-off point" in tissue was 11.4%, while the "minimum cut-off point" was 5%. The 48.6% of cases were positive for methylation in tissue, by MSP, and 55.7% by pyrosequencing. Eight unmethylated cases by MSP resulted methylated by pyrosequencing, whereas in 3 samples the results were reversed. Similarly, 4 samples that were not assessed by MSP had a result by pyrosequencing. For plasma samples, the "best cut-off" for pyrosequencing was 3.4%. 14.9% were methylated by MSP, while 28.6% were methylated by pyrosequencing. The "best cut-off" in serum was 1.6%, a value below the commercial unmethylated DNA, and it had no significant correlation with overall survival. For this reason, the serum was discarded for further analysis.

Conclusions: MSP and pyrosequencing, once the cut-off point is defined, are two valid methods for the *MGMT* methylation status assay, in tissue of GB patients. Even though the agreement between them is not perfect, both results correlate with survival and response to treatment with alkylating agents. Therefore, both techniques are useful. Although our project has shown the

presence of ctDNA in blood and plasma of GB patients, the sensitivity to determine *MGMT* methylation, by either method, is low. The serum does not represent a good source to assess *MGMT* methylation in ctDNA.

RESUMEN

Antecedentes: El glioblastoma (GB) es el glioma maligno más frecuente. Mediante el tratamiento multidisciplinar con cirugía, radio y quimioterapia se consigue una supervivencia mediana de 15 meses. La metilación del promotor del gen *O-6-Metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT)* es un conocido factor pronóstico y predictivo de respuesta a temozolomida en estos tumores, pero su análisis de manera repetida es complejo. Las rebiopsias cerebrales comportan un riesgo para el paciente, además, las muestras de tejido obtenidas pueden no representar la heterogeneidad tumoral. Los avances en el uso de biomarcadores en biopsia líquida la están posicionando como una solución a estos inconvenientes. La determinación de la metilación de *MGMT* se puede llevar a cabo con diversas técnicas, siendo la PCR específica de metilación (MSP) la más utilizada, tanto en ensayos clínicos como en la práctica diaria. La pirosecuenciación es una técnica sencilla y con resultados objetivos que se ha demostrado útil para el análisis de esta alteración epigenética.

En este proyecto, hemos determinado el estado de metilación del promotor de *MGMT*, en muestras de tejido y en ctDNA de muestras sanguíneas, utilizando las técnicas de MSP y pirosecuenciación.

Metodología: Se analizó la metilación de *MGMT* en tejido y sangre de pacientes con GB. 81 muestras de tejido y 83 de sangre, fueron valoradas mediante MSP (CpG 74-78 y 84-87), mientras que 78 de tejido, 56 de suero y 55 de plasma, lo fueron mediante pirosecuenciación (CpG 74-78). Para la pirosecuenciación, se consideraron dos puntos de corte con relevancia clínica: aquel que dividía la cohorte en dos grupos según la máxima diferencia en supervivencia global, llamado “mejor punto de corte”, y el porcentaje mínimo a partir del cual la metilación ya tenía un impacto clínico, llamado “punto de corte mínimo”. Ambos puntos de corte tenían significación estadística.

Resultados: El “mejor punto de corte” en tejido fue de 11,4%, mientras que el “punto de corte mínimo” fue de 5%. El 48,6% de casos fueron positivos para la metilación en tejido, mediante MSP y el 55,7% lo fue por pirosecuenciación. Ocho casos no metilados por MSP, se detectaron metilados por pirosecuenciación, mientras que en 3 muestras pasó a la inversa. Asimismo, 4 muestras no valorables por MSP tuvieron resultado por pirosecuenciación. En plasma, el “mejor punto de corte” para la pirosecuenciación fue 3,4%. 14,9% casos fueron metilados por MSP, mientras que el 28,6% lo fue por pirosecuenciación. El “mejor punto de corte” en suero fue de 1,6%, un valor inferior a las muestras de DNA no metilado comercial y sin correlación significativa con la supervivencia global. Por este motivo, el suero se descartó para análisis adicionales.

Conclusiones: La MSP y la pirosecuenciación, una vez definido el punto de corte, son dos métodos válidos para la determinación de la metilación del promotor del gen de *MGMT*, en tejido de

pacientes con GB. Aunque la concordancia entre ellos no es perfecta, ambos ofrecen resultados que se correlacionan con la supervivencia y la respuesta al tratamiento con agentes alquilantes. Por lo tanto, ambas técnicas son útiles para detectar pacientes que podrían beneficiarse de dichos tratamientos. Pese a que, en nuestro proyecto, se ha demostrado la presencia de ctDNA en sangre y plasma de pacientes con GB, la sensibilidad para la detección de la metilación de *MGMT*, con los dos métodos, es baja. El suero no es una buena fuente para la determinación de metilación de *MGMT* en ctDNA.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El Glioblastoma.

1.1.1 Epidemiología y anatomía patológica

Las primeras referencias sobre el glioblastoma (GB) datan de 1863, cuando Virchow reconoció su origen glial. En 1914, Mallory introdujo el término de glioblastoma multiforme, que fue definitivamente aceptado por Bailey y Cushing en 1926, haciendo referencia a la heterogeneidad de la lesión.

El GB es un glioma de alto grado cuyas características histopatológicas incluyen una población astrocítica de aspecto fibrilar y gemistocítico, con presencia de atipia nuclear, actividad mitótica y proliferación microvascular con o sin necrosis. La necrosis se diferencia en necrosis tipo infarto y/o necrosis con empalizada nuclear (la conocida previamente como necrosis con pseudoempalizada), en la que las células se agrupan alrededor del centro necrótico con el núcleo celular orientado hacia él (1) (Figura 1).

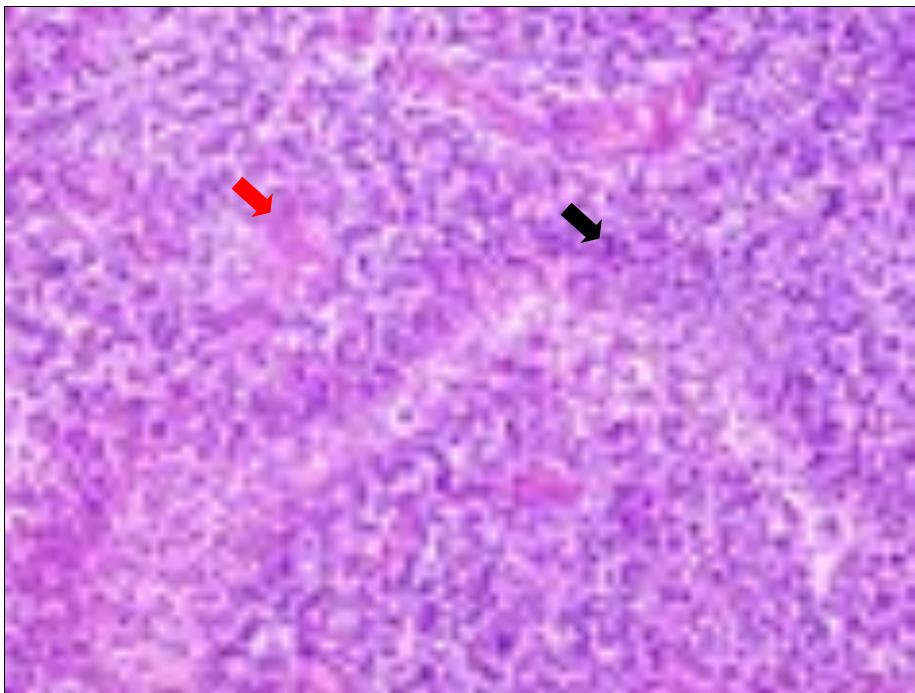


Figura 1. Imagen histológica característica de un GB. Se observa una proliferación astrocitaria de características neoplásicas, con proliferación microvascular (**flecha roja**) y necrosis con empalizada nuclear (**flecha negra**).

Así pues, el GB se incluye dentro de los gliomas, es decir, tumores que remedan a la glía. Éstos se dividen, según su grado histológico, en grado I-II (bajo grado) y grado III-IV (alto grado) y, según su capacidad de invasión del parénquima cerebral circundante, en gliomas difusos o infiltrantes y gliomas circunscritos. Los primeros, tienen la habilidad de invadir el resto de cerebro sano, de modo que, aunque su resección sea completa, recaerán (2). Otra de las características de los gliomas difusos es su progresión a alto grado. Los tumores difusos de grado II, no solo recaerán, aún habiéndose resecado de manera completa, sino que muchos lo harán progresando a grado III (glioma anaplásico) o incluso a grado IV, es decir, a GB (3).

El GB es el tumor glial de alto grado más frecuente (56,6%), con una incidencia de 3,21 casos por cada 100.000 habitantes (4), una mediana de edad al diagnóstico de 64 años y una relación hombre/mujer de 1,6 (5). Es el glioma maligno con peor pronóstico en adultos, con una supervivencia a 5 años del 5% y supervivencia mediana de 15 meses (m) en pacientes tratados con el esquema estándar combinando quimio y radioterapia (6, 7).

Aunque poco se conoce sobre los posibles factores de riesgo asociados, la exposición a radiaciones ionizantes ha demostrado un aumento de riesgo de GB, mientras que la historia previa de alergia o atopia y el uso de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) parecen actuar como factor protector (8, 9). En cuanto a su posible asociación genética, menos del 1% de GB se diagnostica en el contexto de un síndrome hereditario. Los síndromes conocidos que incluyen al GB son el síndrome de Turcot, el de Li-Fraumeni y la neurofibromatosis tipo 1 (10).

Anatómicamente, afecta con preferencia a los hemisferios cerebrales, en la región subcortical y puede originarse de novo (GB primario) presentándose en pacientes de edad media, sin un precursor conocido o, como se ha comentado previamente, a partir de la evolución molecular de un glioma de menor grado (GB secundario), hecho que se da en el 5% de los casos. Estos dos subtipos tienen características moleculares y clínicas diferentes (3, 11).

Clásicamente, los gliomas infiltrantes se han dividido en dos subtipos histológicos, según la célula de origen a la que se asemejan: los astrocitomas, con similitudes con los astrocitos, y los oligodendrogliomas (OD), con los oligodendrocitos. Entre ellos, se consideraba un tercer subtipo intermedio llamado tumor mixto u oligoastrocitario (OA). Dentro de estos subtipos, la Organización Mundial de la Salud (OMS), organismo encargado de la clasificación histológica de las neoplasias humanas, otorga un grado de malignidad del II al IV, ordenando los gliomas

infiltrantes de menor a mayor agresividad. De este modo, hasta hace poco, dentro de los astrocitomas se consideran tumores de alto grado el astrocitoma anaplásico (grado III) y el astrocitoma infiltrante grado IV o GB, siendo el astrocitoma difuso de bajo grado, el grado II. En el grupo de los OD se diferencian, de menor a mayor grado, el OD (grado II) y el OD anaplásico (grado III). No existen OD puros grado IV. En el subtipo mixto, hasta el momento, se consideraba el OA como el tumor grado II y el OA anaplásico como el grado III. El OA grado IV se identificó como un GB con componente oligodendroglial (12).

En 2016 se publicó una nueva guía de la OMS para tumores del sistema nervioso central (SNC), en la que, por primera vez, se añadían criterios moleculares a los histológicos para definir las entidades. Los cambios más llamativos han sido: la desaparición del subtipo OA *per se*; la diferenciación de los GB, según una mutación de isocitrato deshidrogenasa (*IDH*), en GB con o sin mutación de *IDH*; y la descripción de un nuevo subtipo, los gliomas difusos de línea media, con mutación H3K27M (aunque la OMS y diversas publicaciones le han asociado este nombre, la correcta nomenclatura de la mutación es K28M). Estos tumores son clínicamente muy agresivos y corresponden a un grado IV (13).

Así pues, actualmente, el estudio mutacional de *IDH1* e *IDH2* se considera básico para clasificar los gliomas infiltrantes, así como el análisis de la codeleción de 1p/19q, ya que ambas son necesarias para el diagnóstico de OD (grado II y III). Por otro lado, aunque sin considerarse necesarias para el diagnóstico, las mutaciones de *ATRX* y *TP53* en los gliomas infiltrantes son características de la estirpe astrocitaria.

Las entidades que se distinguen actualmente, dentro de los astrocitomas infiltrantes, son el astrocitoma difuso grado II y el astrocitoma anaplásico (grado III) con o sin mutación de *IDH*. Los anteriormente llamados OA se reclasifican, según las alteraciones moleculares previamente explicadas, en OD o astrocitoma difuso. El GB, por su parte, se sigue considerando un astrocitoma difuso, aunque la presencia o no de mutación de *IDH* hace diferenciar dos grupos totalmente distintos, el GB con mutación de *IDH* (GB-IDHm) y el GB sin mutación de *IDH* (GB-IDHwt). Esta nueva clasificación hace que los términos GB primario y secundario prácticamente puedan darse por substituidos por los de GB-IDHwt y GB-IDHm, respectivamente. En la tabla 1 se resumen las diferencias más destacables entre esas dos entidades.

	GB-IDHwt	GB-IDHm
Término previo	GB primario	GB secundario
Lesión precursora	No identificable	Astrocitoma grado II / III
Proporción de GB	90%	10%
Edad mediana al diagnóstico	62 años	44 años
Relación hombre/mujer	1,42:1	1,05:1
Mediana de duración de síntomas previa al diagnóstico	4 meses	15 meses
Supervivencia mediana	15 meses	31 meses
Localización	Supratentorial	Preferentemente frontal
Necrosis	Extensa	Limitada
Mutación del promotor de <i>TERT</i>	72%	26%
Mutación de <i>TP53</i>	27%	81%
Mutación de <i>ATRX</i>	Excepcional	71%
Amplificación de <i>EGFR</i>	35%	Excepcional
Mutación de <i>PTEN</i>	24%	Excepcional

Tabla 1. (Adaptada de (13)). Características de los GB-IDHwt y GB-IDHm.

El cIMPACT-NOW (*The Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy*) fue un grupo formado a raíz de la nueva clasificación de la OMS 2016 (Tabla 2), con el fin de resolver cuestiones sobre el grado y la clasificación. Este equipo, analizó la supervivencia en pacientes con astrocitomas difusos grado II o III con IDHwt, concluyendo que un subgrupo de éstos se comportaba de un modo más agresivo, similar a un GB. En conclusión, determinó que la amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o la mutación de *TERT* o la combinación de ganancia del cromosoma 7 y pérdida del 10 (+7/-10) eran básicas para caracterizar estos casos (14). Así, proponen el nombre de “Glioma astrocitario difuso, IDHwt, con características moleculares de GB, grado IV de malignidad de la OMS”, para los astrocitomas grado II o III, con alguna de estas alteraciones.

Dado el caso que la histología y la biología molecular, de un tumor, no concordaran, será esta última la que dicte el diagnóstico. Teniendo en cuenta que algunos casos no podrán ser clasificados, por no disponerse del resultado molecular, se propone una subclasificación mencionando NOS (no especificado).

Astrocitoma difuso con mutación IDH <ul style="list-style-type: none"> - Astrocitoma gemistocítico con mutación IDH Astrocitoma difuso sin mutación IDH Astrocitoma difuso, NOS
Astrocitoma anaplásico con mutación IDH Astrocitoma anaplásico sin mutación IDH Astrocitoma anaplásico, NOS
Glioblastoma sin mutación IDH <ul style="list-style-type: none"> - Glioblastoma de células gigantes - Gliosarcoma - Glioblastoma epitelioides Glioblastoma con mutación IDH Glioblastoma, NOS
Glioma difuso de línea media con mutación H3 K27M
Oligodendroglioma con mutación IDH y codeleción 1p/19q Oligodendroglioma, NOS
Oligodendroglioma anaplásico con mutación IDH y codeleción 1p/19q Oligodendroglioma anaplásico, NOS
Oligoastrocitoma, NOS
Oligoastrocitoma anaplásico, NOS

Tabla 2. (Adaptada de (13)). Clasificación de la OMS para tumores del SNC. Astrocitomas difusos y tumores oligodendrogliales.

Bajo el punto de vista histológico, los GB se pueden distinguir en variantes y patrones morfológicos como por ejemplo: el GB de células gigantes, el GB de células pequeñas, el GB epitelioides y el gliosarcoma. En éste último, aún teniendo muchas similitudes genéticas con el GB, parece que la metilación del promotor del gen O-6-Metilguanina-DNA-metiltransferasa (*MGMT*) y la amplificación de *EGFR* son menos frecuentes (15).

1.1.2 Características clínicas

La historia clínica previa al diagnóstico del GB suele ser corta, menor de 3 meses en el 50% de los casos, sobretodo en el caso de los GB primarios.

Los tumores cerebrales malignos afectan con mayor frecuencia el lóbulo frontal (23,9%), seguido del temporal (17,5%), el parietal (10,4%) y el occipital (2,7%) (4). Esta localización es la que determinará parte de la sintomatología, pudiendo producir alteraciones del campo visual, del lenguaje o de la memoria, cambio de personalidad, déficit motor o sensitivo y convulsiones (Figura2).

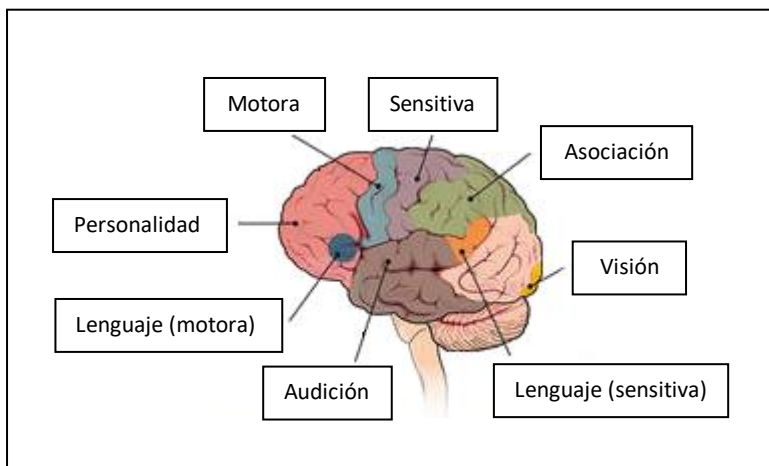


Figura 2. (Adaptada de (16)). Funciones de las distintas áreas cerebrales.

A estos síntomas se puede añadir clínica secundaria a la hipertensión intracraneal, como son la cefalea de predominio matutino y el vómito en escopetazo. La forma de presentación más frecuente son las convulsiones, que sufren hasta un tercio de los pacientes, la cefalea y las alteraciones por afectación de tracto neurológico largo (vías motoras o sensitivas) (17).

1.1.3 Radiología

La mayoría de pacientes se diagnostican a raíz de una visita al servicio de urgencias, muchas veces no por un cuadro florido, sino por la progresión de una clínica sutil que lleva finalmente a la consulta y a la realización de una prueba de imagen. La exploración inicial suele ser una tomografía computarizada (TC) que detecta una anomalía, siendo la imagen más usual la de una lesión con captación de contraste periférico (en anillo), con un centro necrótico. El diagnóstico final, requiere de la obtención de una imagen típica por resonancia magnética (RM) y de la confirmación anatomopatológica, mediante el procedimiento quirúrgico.

El GB es un tumor cuya agresividad va asociada a una elevada capacidad para la proliferación y neovascularización. La neuro-imagen permite identificar estos vasos sanguíneos anómalos, con aumento de permeabilidad, mediante la observación de una intensificación de contraste e incremento de metabolismo.

Las pruebas de imagen, en los tumores del SNC, tienen un papel en cinco escenarios fundamentales: diagnóstico tumoral, planificación prequirúrgica, imagen intraquirúrgica, imagen postquirúrgica y valoración de respuesta a tratamiento y seguimiento. La imagen preintervención es útil para determinar el número de lesiones, la localización del tumor y su relación con las estructuras anatómicas adyacentes, y la elocuencia. Se llama área elocuente a aquella área cortical específica para una determinada función cerebral. También ayuda a caracterizar la

imagen, proporcionando una información preliminar sobre el tipo y grado tumoral. La imagen intraquirúrgica (conocida como sistemas de neuro-navegación) mejora la localización de la lesión tumoral y ayuda a minimizar el daño de tejido sano durante la resección. En un período máximo de 72 horas postquirúrgicas, preferiblemente 24 horas, con el fin de minimizar la captación de contraste de la cavidad, debe realizarse una RM informativa del porcentaje de resección (18).

Aunque, como se ha comentado previamente, la TC cerebral con contraste se usa como exploración para un despistaje inicial, la RM es la prueba principal en la valoración de éstos tumores, con una sensibilidad cercana al 75% y una especificidad del 65% (19).

1.1.3.1 Resonancia magnética (RM)

La RM ha supuesto uno de los avances más importantes en el diagnóstico y seguimiento de los tumores cerebrales. Esta prueba, nos describe la morfología del tumor y la reacción del tejido circundante al mismo, aprovechando la característica de espín de los núcleos atómicos. Los núcleos atómicos con espín distinto a cero, aquellos con número impar de neutrones y/o protones, sometidos a un campo magnético externo, son capaces de absorber ondas electromagnéticas en el rango de las radiofrecuencias (20). La liberación de esta energía (relajación) permite obtener imágenes anatómicas. Las propiedades de la relajación, que viene definida por dos componentes, T1 (espín-entorno) y T2 (espín-espín), proporcionan el contraste entre los diferentes tejidos (1).

En general, los tumores del SNC, son hipointensos en T1 e hiperintensos en T2, debido a un aumento del contenido líquido en el tumor y al edema vasogénico. No obstante, hay excepciones, ya que algunos tumores pueden ser hiperintensos en T1 e hipointensos en T2, como los que contienen hemosiderina, melanina, calcificaciones y mucina. Tras el paso de contraste endovenoso (gadolinio), la captación es variable, dependiendo de la vascularización de la lesión y de la integridad de la barrera hemato-encefálica (BHE). Un aumento de captación de contraste es sugestivo de lesión agresiva, por rotura de la BHE y, por tanto, de un tumor de alto grado (21). No obstante, otros factores como la irradiación o el uso de corticoides pueden traducirse en rotura de ésta y, por tanto, en captación de contraste.

En la tabla 3, se muestran los diagnósticos diferenciales a valorar según la intensidad de la imagen.

Intensidad de imagen	Hallazgos compatibles
Hiperintensidad en T1	<p>Metahemoglobina (hemorragia subaguda), melanina (metástasis de melanoma). Alto contenido en proteínas (quiste coloide, craneofaringioma). Grasa (lipoma), colesterol. Agente paramagnético (gadolinio). Magnesio, hierro, cobre, calcio.</p>
Hipointensidad en T2	<p>Hierro (sangre) con necrosis (GB). Hemosiderina (hemorragia crónica), desoxihemoglobina (hemorragia aguda). Calcificación (oligodendroglioma). Elevada relación núcleo-citoplasma (tumor neuroectodérmico primitivo, linfoma). Estroma de fibrocolágeno (meningioma). Alto contenido en proteínas (craneofaringioma). Flujo sanguíneo elevado (hemangioblastoma, GB). Melanina, ferritina, mucina.</p>

Tabla 3. (Adaptada de (21)). Hallazgos compatibles con hiperintensidad en T1 y/o hipointensidad en T2.

Algunas de las secuencias de pulsos, que suelen usarse para definir mejor los tumores del SNC, en RM, son el FLAIR (Fluid-Attenuated Inversion Recovery) y el STIR (Short TI Inversion Recovery).

La secuencia FLAIR realza imágenes destacadas en T2, anulando el líquido céfalo raquídeo (LCR) (21). El FLAIR con contraste es útil para diferenciar al tumor del tejido circundante y para identificar metástasis leptomenígeas.

El STIR suprime la señal grasa para mejorar el realce de contraste en T1 / T2. Es una secuencia útil para diferenciar las lesiones grasas de las hemorragias, así como para el estudio de las tumoraciones orbitarias o de la médula ósea(21).

El GB se origina, habitualmente, en la sustancia blanca subcortical, provocando un efecto masa con edema vasogénico, secundario a la trasudación de fluidos y proteínas al espacio extracelular, debido a la rotura de la BHE. La mayoría, se presentan en forma de lesiones únicas, aunque pueden ser multifocales, en un mismo lóbulo cerebral, hasta en un 10% de los casos, o multicéntricas, en diferentes lóbulos, en un 1% (22). En los casos en que el tumor atraviesa el cuerpo calloso se forma una imagen, por afectación de los centros semioviales, conocida como “imagen en alas de mariposa”. La imagen típica del GB está compuesta por una mezcla de áreas de tumor sólido con parte quística, zonas hemorrágicas con necrosis (normalmente central) y edema. Todo ello sumado dificulta, de manera notoria, su interpretación. Con la finalidad de ayudar en la identificación de estas imágenes heterogéneas, se han desarrollado nuevas técnicas de neuro-radiología, que han ido incorporando el estudio de alteraciones funcionales, hemodinámicas, metabólicas y celulares (21, 23). Éstas se desarrollan a continuación:

Difusión: Las imágenes en difusión se basan en la movilidad de las moléculas de agua y nos permiten obtener el valor llamado “coeficiente de difusión aparente” (ADC). Este valor está directamente relacionado con la celularidad, de tal manera que a mayor ADC, mayor celularidad y, por tanto, menor movilidad de las moléculas (23). El ADC permite diferenciar entre distintos tumores del SNC (21) (Figura 3).

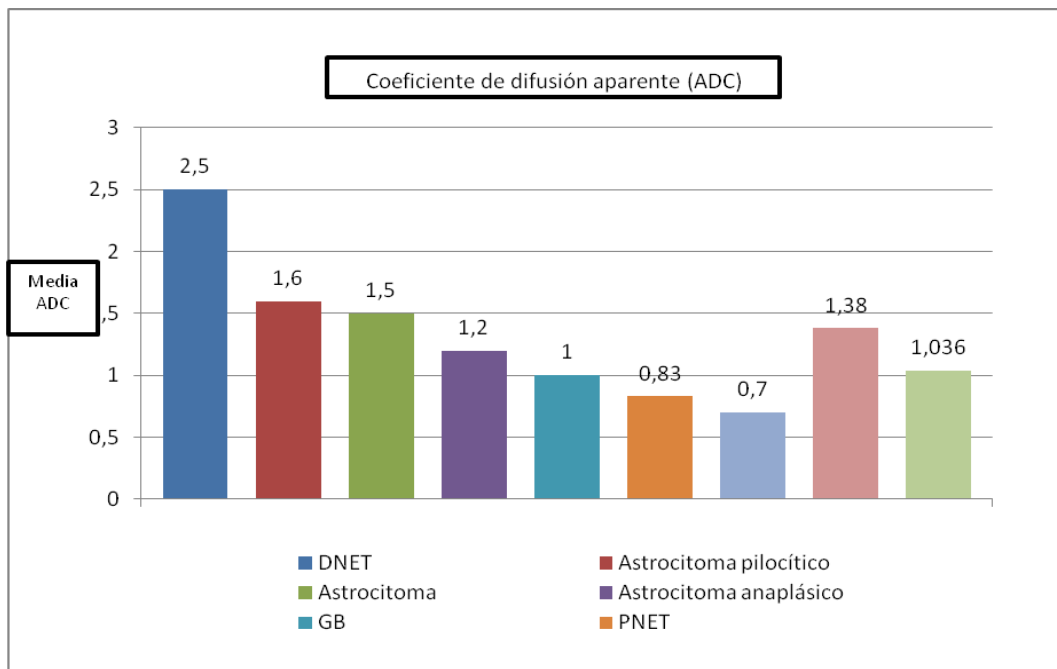


Figura 3. (Adaptada de (21)). ADC en diferentes tumores cerebrales.

Tractografía: Es una técnica novedosa de difusión, en la que se estudian los fascículos de sustancia blanca. La identificación de estas estructuras tiene un importante valor en la planificación quirúrgica.

Perfusión: Permite obtener mapas de volumen sanguíneo regional del cerebro, que reflejan la densidad vascular y el potencial de angiogénesis tumoral, marcadores de malignidad y alto grado tumoral, por lo que ayuda a identificar un glioma de alto grado. Así mismo, es determinante para localizar la zona óptima en la que realizar una biopsia, en los tumores no resecables.

Espectroscopia: Expresa los cambios metabólicos en presencia de tumores, pero no ofrece una buena descripción anatómica. En gliomas de alto grado, es característico encontrar un pico de colina, un descenso del pico de N-acetil aspartato (NAA), un aumento del coeficiente colina/creatina y, en algunos casos, un pico de lactato. Los metabolitos responsables de la señal

del NAA se encuentran básicamente en las neuronas, así pues, una reducción de ésta señal traduce una destrucción de neuronas, debido al proceso tumoral (21). La colina, por su lado, es un marcador de membrana y se correlaciona positivamente con la celularidad y el índice de proliferación.

Figura 4. Imagen por RM de un GB.

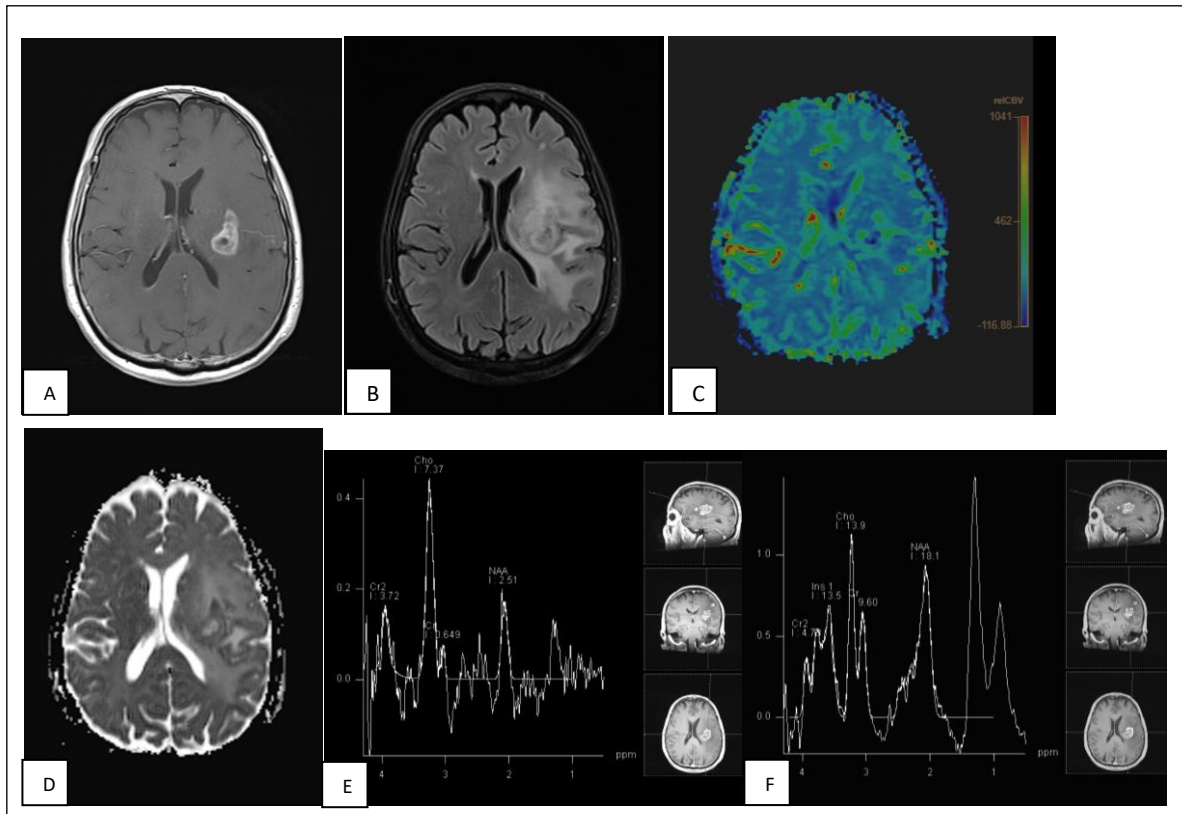


Figura 4. Imagen por RM de un GB (cedida por la Dra. Sara Castanyer).

A: T1 contraste. **B:** FLAIR. **C:** Perfusión. **D:** Difusión. **E y F:** Patrón de espectroscopia obtenido a tiempo de ECO corto (**E**) y largo (**F**). Disminución del valor de NAA y elevación de colina, con aumento de ratio colina/creatina (Cho/Cr). Presencia de lípidos, indicador de necrosis, y, en menor medida, presencia de lactato y de glicina/mioinositol, marcador de glía.

1.1.3.2 Tomografía por emisión de positrones (PET)

La tomografía por emisión de positrones (PET) ofrece una caracterización funcional, mediante el uso de diferentes trazadores, que consigue una visualización de procesos biológicos como la proliferación, la síntesis de membranas y el consumo de glucosa y de aminoácidos (24). Esta técnica, podría permitir definir los márgenes de resección, planificar una irradiación, identificar áreas sugestivas de alto grado y diferenciar entre los cambios producidos por el tratamiento y una recidiva (25).

Según el radiofármaco utilizado, se encuentra la PET con ^{18}F -2-fluoro-2-deoxi-D-glucosa (PET-FDG) o la PET con aminoácidos. La PET-FDG tiene poco interés en el GB, debido a la captación de glucosa fisiológica en la corteza cerebral sana, aunque sí se puede considerar para discernir entre un glioma de alto grado y otras neoplasias cerebrales. Así pues, por ejemplo, los valores de captación máximos estandarizados (SUVmax) son mayores en linfomas del SNC que en GB, pero el diagnóstico diferencial entre gliomas de alto grado y metástasis cerebrales es más limitado (26, 27). Del mismo modo, lesiones no neoplásicas, tales como procesos inflamatorios o infecciosos, también pueden presentar cierta captación de FDG (26).

La PET con aminoácidos permite diferenciar tejido tumoral de tejido no tumoral, ya que la captación de aminoácidos en el tejido cerebral normal es muy baja. La captación tumoral de los aminoácidos no depende exclusivamente de la disrupción de la BHE, sino también de transportadores específicos, iguales a los utilizados por los aminoácidos naturales. Por tanto, los tumores cerebrales muestran captación de estos radiofármacos, independientemente de que presenten realce con gadolinio en los estudios de RM.

Los aminoácidos más frecuentemente usados son la metionina (11C-metil-metionina, 11C-MET), la tirosina (O-2- ^{18}F -fluoroetil-L-tirosina, ^{18}F -FET) y la DOPA (3,4-dihidroxi-6- ^{18}F -fluoro-L-fenilalanina, ^{18}F -FDOPA). Cada uno de ellos ha demostrado mayor especificidad en diferentes escenarios (diferencia entre glioma maligno y benigno, respuesta a tratamiento y progresión...) (28). En la tabla 4 se resume la utilidad de cada uno de los aminoácidos frente a la RM.

Estos marcadores, han demostrado tener una elevada sensibilidad para el diagnóstico de GB, en comparación con la FDG (por ejemplo, más del 95% de los gliomas de alto grado presentan consumo de tirosina), por lo que se consideran superiores en el diagnóstico de los tumores cerebrales (29).

Diversos estudios, validados con muestras histológicas, han demostrado la exactitud de la PET con aminoácidos frente a la RM, en la diferenciación de lesiones tumorales y no tumorales (30, 31).

Problema clínico	Metionina	Tirosina	F-DOPA
Diferenciación entre glioma y lesión no neoplásica	Mayor precisión que RM sola	Mayor precisión que RM sola	No disponible para el diagnóstico inicial
Gradación de un glioma	Mayor precisión que RM sola, limitada por el solapamiento entre grados de la OMS	Mayor precisión que RM sola, en concreto por combinación de la FET-PET dinámica y la difusión de la RM	No hay estudios que lo comparen
Delimitación de la extensión del glioma	El tumor metabólicamente activo, es mayor que la captación de contraste al diagnóstico y/o recurrencia Aumento de metabolismo en gliomas anaplásicos que no captan contraste	En GB de recién diagnóstico, el tumor metabólicamente activo, es mayor que la captación de contraste pre y postquirúrgica	En glioma, el tumor metabólicamente activo, es mayor que el rCBV, ADC y la captación de contraste
Diferenciación entre recurrencia y cambios inducidos por el tratamiento	Mayor precisión que RM	Mayor precisión que RM	Mayor precisión que RM
Valoración de la respuesta tumoral	Superior a la RM La respuesta metabólica a TMZ predice la supervivencia	Superior a la RM Respuestas más tempranas a TMZ, RT y Bev. Asociado con mejor supervivencia	Superior a la RM Respuesta metabólica más temprana a Bev y predictiva de mejor supervivencia
Valoración pronóstica en gliomas	El volumen tumoral, metabólicamente activo, tiene valor pronóstico en alto grado	El volumen tumoral, metabólicamente activo, tiene valor pronóstico en glioma grado IV El SUVmax y hallazgos específicos de RM son factores pronósticos en grado II	Superior a la RM en glioma grado II El SUVmax es un factor de pronóstico independiente de progresión

Tabla 4. (Adaptada de (28)). Comparación entre la utilidad de la RM y la PET con aminoácidos. Abreviaturas: RM: Resonancia magnética, rCBV: Volumen sanguíneo cerebral relativo, ADC: Coeficiente de difusión aparente, Bev: Bevacizumab, SUVmax: Valores de captación máximos estandarizados, FET-PET: PET con tirosina.

Así pues, se considera que, ante un diagnóstico dudoso, la PET con aminoácido ofrece una mayor sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica frente a la PET-FDG en la diferenciación de tejido no tumoral y los gliomas (28).

Las principales limitaciones de esta prueba son: la disponibilidad de la tecnología (no todos los centros disponen de una PET), el acceso al aminoácido (la metionina necesita generarse en un ciclotrón) y el reembolso del coste por parte del sistema sanitario.

Las indicaciones propuestas para la PET con aminoácido se resumen en el algoritmo de la figura 5.

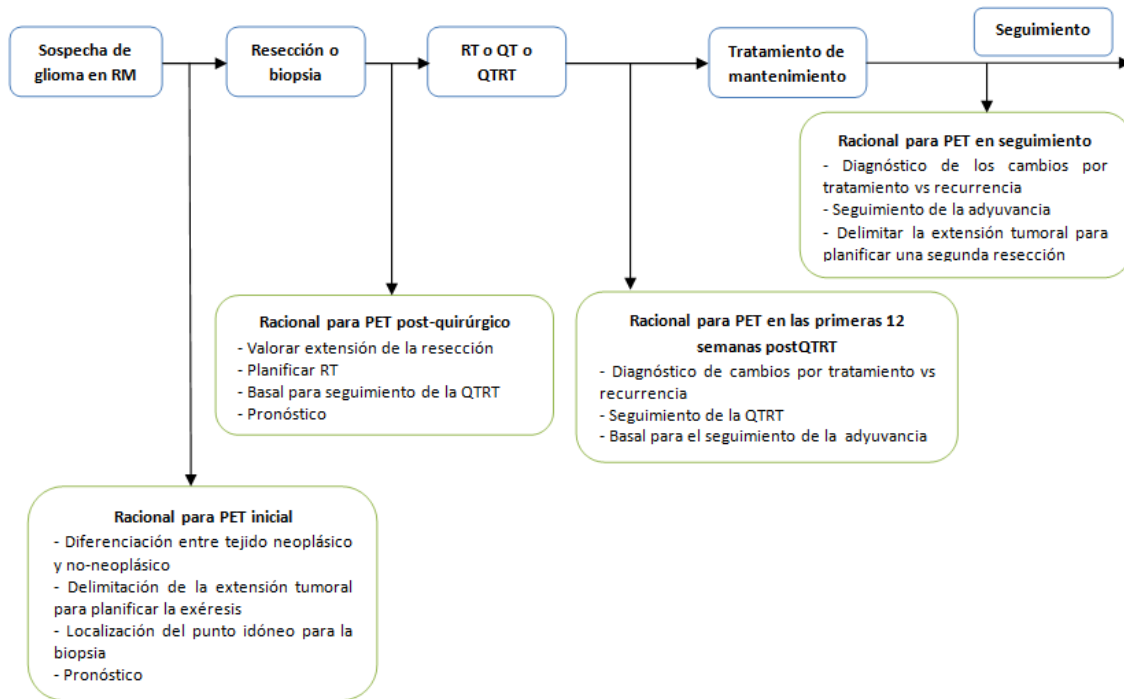


Figura 5. (Adaptada de (28)). Algoritmo de las indicaciones para la PET con aminoácido sugerido por Albert y colaboradores (28).

1.1.3.3 Valoración de respuesta

Los criterios de respuesta radiológicos de los tumores cerebrales, eran los mismos que el resto de tumores sólidos, valorándose las medidas tumorales bidimensionales y la captación de contraste, hasta que los neuro-oncólogos sugirieron que se debía adoptar un criterio de respuesta uniforme y específico para ellos. Los criterios RECIST (del inglés, *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) para la evaluación de tumores sólidos, tenían en cuenta las medidas unidimensionales de las lesiones diana, pero no contaban con el estado clínico ni la necesidad de cortico-terapia (32). No fue hasta el año 1990, en que Macdonald escribió los primeros criterios de respuesta radiológica específicos para la neuro-oncología (33, 34). Macdonald tuvo en cuenta, no sólo la imagen radiológica, sino también el estado neurológico del paciente y las dosis de corticoides. Clasificó la respuesta radiológica en cuatro categorías: respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE) y progresión de enfermedad (PE). Se valoraba como RC la desaparición total de la captación de contraste, en los pacientes con estabilidad o mejoría clínica

a nivel neurológico, sin precisar esteroides; RP: la reducción de más del 50% en la zona captante de contraste, sin aumento de corticoides y sin empeoramiento neurológico; PE: el aumento del 25%, o más, en la lesión captante o empeoramiento neurológico, con esteroides estables o en aumento. El resto de posibilidades se interpretaba como EE.

Aun habiendo avanzado en la descripción de los criterios, surgieron nuevas dudas en la interpretación, básicamente en lo que refería a las zonas captantes de contraste y las no captantes. La valoración de las lesiones no captantes de contraste, en la secuencia T2 o FLAIR, es esencial para medir el crecimiento infiltrativo o difuso. La imagen radiológica de patrón difuso es frecuente en el GB, ya sea en el momento del diagnóstico o en la recurrencia.

La captación de contraste, puede ser la traducción de múltiples fenómenos no tumorales como la inflamación, la actividad epiléptica, los cambios posquirúrgicos y la isquemia, eventos no sinónimos de progresión (35-37). Un concepto radiológico que merece especial mención, es el fenómeno de pseudoprogresión (PsP). La PsP es el aumento de volumen tumoral, edema y captación de contraste, debido al incremento de la permeabilidad vascular, inducida por los tratamientos citotóxicos (quimioterapia y radioterapia) y se da hasta en un 20-30% de pacientes. Se define como la aparición de nuevas captaciones y/o edema, en ausencia de progresión, seguida de una mejoría o estabilización, sin un cambio de tratamiento (38, 39). Este fenómeno, está relacionado con el tratamiento de quimio-radioterapia (QTRT), y su incidencia es máxima en el período de las 12 semanas tras finalizar la irradiación. Es más frecuente en los tumores con metilación del promotor del gen *MGMT*, puede ir acompañada de empeoramiento neurológico y su impacto sobre el pronóstico está en discusión (40).

Otro hallazgo que se puede apreciar, en este caso ligado al tratamiento con agentes antiangiogénicos, es la pseudorespuesta (PsR). Se trata de una reducción de la captación de contraste y del edema peritumoral, como consecuencia de la reducción de la permeabilidad vascular. Así pues, se debe mayormente a la normalización de la vascularización y no a respuesta al fármaco antitumoral *per se* (41, 42).

En la figura 6 podemos apreciar los cambios evolutivos en una RM multiparamétrica.

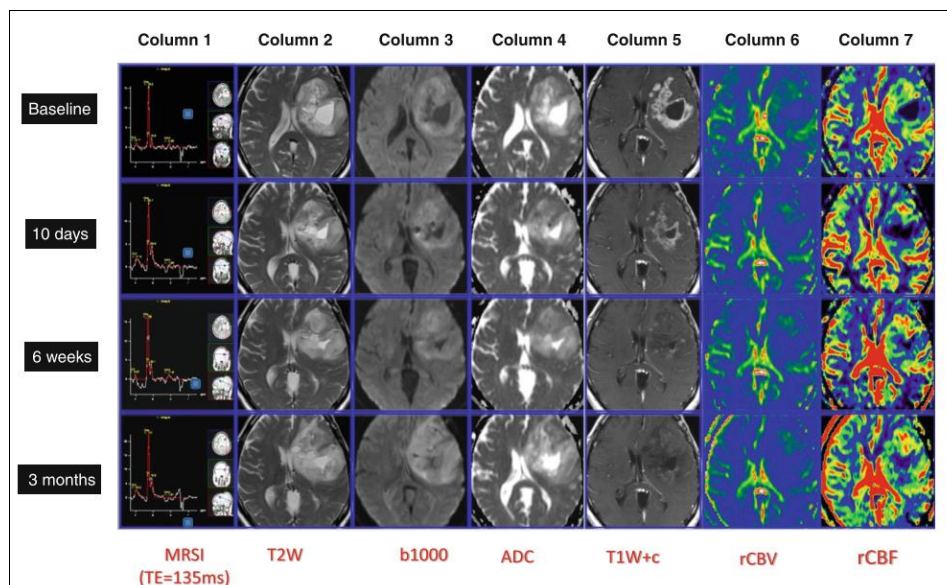


Figura 6. (Extraída de (43)). RM multiparamétrica de un GB tratado con un antiangiogénico. Se observa imagen de PsR precoz con normalización vascular. **Columna 1:** Pico de colina estable 3 meses después del tratamiento, es decir, ausencia de muerte celular. **Columna 2:** Imagen en T2 con discreta reducción del componente quístico y del efecto masa. **Columna 3:** Difusión estable, no se observa necrosis celular. **Columna 4:** Reducción significativa de la captación de contraste, que se inicia el día 10 y se mantiene hasta los 3 meses. Reducción de la permeabilidad de la BHE (PsR). **Columna 5 y 6:** Reducción precoz de la perfusión, debido a la normalización vascular.

Todas estas características y alteraciones observadas en el GB conllevaron a un replanteamiento de los criterios de Macdonald, para dejar de asociar la captación de contraste con la progresión e introducir nuevos conceptos, como la consideración de las regiones no captantes.

Así fue como el grupo de trabajo conocido como RANO (*Response Assessment in Neuro-Oncology*) implementó unos criterios nuevos, en los que se tenían en cuenta la PsP y la PsR (44). Con intención de definir mejor el término de PsP, el grupo consensuó que, durante las 12 primeras semanas posteriores al tratamiento con QTRT, solamente podía diagnosticarse una progresión en caso de objetivarse una nueva captación de contraste, fuera del campo de irradiación, o si existía una confirmación histológica, considerándose el resto de casos como PsP (44).

En la tabla 5 se muestran los diferentes cambios aplicados en los criterios de valoración de respuesta al tratamiento, del GB.

	RECIST 1.1	MCDONALD	RANO
RC	Desaparición de todas las lesiones	Desaparición total de captación + estabilidad clínica (o mejoría) + No corticoides	Igual que McDonald + T2/FLAIR estable o ↓
RP	↓ ≥30% suma de los diámetros máximos	↓ ≥50% de la lesión captante = o ↓ esteroides = o mejor neurológicamente No nuevas lesiones	Igual que McDonald + T2/FLAIR estable o ↓
PE	↑ ≥20% suma de diámetros	↑ ≥25% en la lesión captante o empeoramiento neurológico con esteroides = o ↑ Aparición de lesión nueva	Igual que McDonald + T2/FLAIR estable o ↑
EE	Cualquier otro escenario	Cualquier otro escenario	Cualquier otro escenario

Tabla 5. Resumen de los 3 criterios principales para valoración de respuesta. Abreviaturas: RC: Respuesta completa. RP: Respuesta parcial. PE: Progresión de la enfermedad. EE: Enfermedad estable.

Estos criterios siguen en constante evolución, y con los nuevos tratamientos para los tumores cerebrales, han ido surgiendo nuevas dudas diagnósticas. Las pruebas funcionales, previamente explicadas (difusión, perfusión...), están intentando resolver algunos de estos problemas, así como la adaptación a otros tratamientos, que pueden modificar, eventualmente, la imagen. Así, por ejemplo, recientemente se han publicado los criterios iRANO, para el seguimiento de pacientes tratados con inmunoterapia (45).

1.1.4 Factores pronósticos y predictivos

La supervivencia mediana de los pacientes afectados de GB se ve influenciada por diversos factores pronósticos. Entendemos por factor pronóstico aquel que interfiere en la evolución de la enfermedad, en el momento del diagnóstico, y por factor predictivo, el que nos ofrece datos sobre la respuesta al tratamiento.

Los primeros estudios realizados ya posicionaron la edad como el factor pronóstico independiente más importante. El estado funcional del paciente, medido a través de escalas, como el Índice de Karnofsky (IK) o el Eastern Cooperative Group (ECOG) Performance Status (PS) (Tabla 6), también ha demostrado tener impacto en la supervivencia.

Índice de Karnofsky (IK)	ECOG. PS.
100: Normal	0: Completamente activo
90: Mínimos síntomas. Actividad normal. 80: Actividad normal con esfuerzo. Algunos síntomas o signos de la enfermedad.	1: Actividad restringida pero ambulatorio y capaz de llevar a cabo trabajo ligero.
70: Se cuida de sí mismo. No puede llevar a cabo una actividad normal ni trabajar. 60: Necesita asistencia ocasional. Capaz de la mayoría de auto-cuidados.	2: Ambulatorio. Capaz de auto-cuidarse pero no de trabajar. Activo >50% horas diarias.
50: Requiere asistencia y cuidados médicos frecuentes. 40: Discapacitado. Requiere asistencia especial.	3: Capaz de auto-cuidados limitados. Confinado en la cama >50% horas diarias.
30: Severamente discapacitado. Requiere hospitalización. 20: Gravemente enfermo. Hospitalizado con requerimiento de tratamiento de soporte. 10: Moribundo.	4: Incapaz de auto-cuidarse. Encamado.
0: Muerto.	5: Muerto.

Tabla 6. Escalas para valorar el estado funcional. IK y PS.

El análisis más importante, en lo que se refiere a estos factores, fue el llevado a cabo por Curran y colaboradores, y es conocido como análisis de particiones recursivas (en inglés, *recursive partitioning analysis*, RPA), un método estadístico para construir diagramas de árboles con el fin de diferenciar seis grupos pronósticos (46). Sus objetivos fueron: analizar la contribución de las variables pretratamiento en el pronóstico, definir la influencia del tratamiento en tres estudios aleatorizados (RTOG 74-01 ECOG 1374, RTOG 79-18 y RTOG 83-02), que incluyeron diversos grados tumorales, e identificar subgrupos de pacientes con supervivencias marcadamente diferentes, con intención de poder estratificarlos en posteriores estudios. Se extrajeron datos de 1578 pacientes que confirmaron la importancia pronóstica de la edad, la histología y el PS, a los que añadieron el estado neurológico, medido por el Test de Minimental (MMSE, ver anexo 1). En lo que se refiere al tratamiento que recibían los pacientes, se objetivó que la extensión de la cirugía y la dosis de RT también tenían un impacto pronóstico. Las conclusiones extraídas, de las variables examinadas, permitieron clasificar a los pacientes en 6 grupos pronósticos perfectamente diferenciados según su supervivencia. Los pacientes con mejor pronóstico (grupo I) alcanzaban una supervivencia de 58,6 meses, mientras que en los de peor pronóstico (grupo VI) era de 4,6 meses (Figura 7,8 y tabla 7).

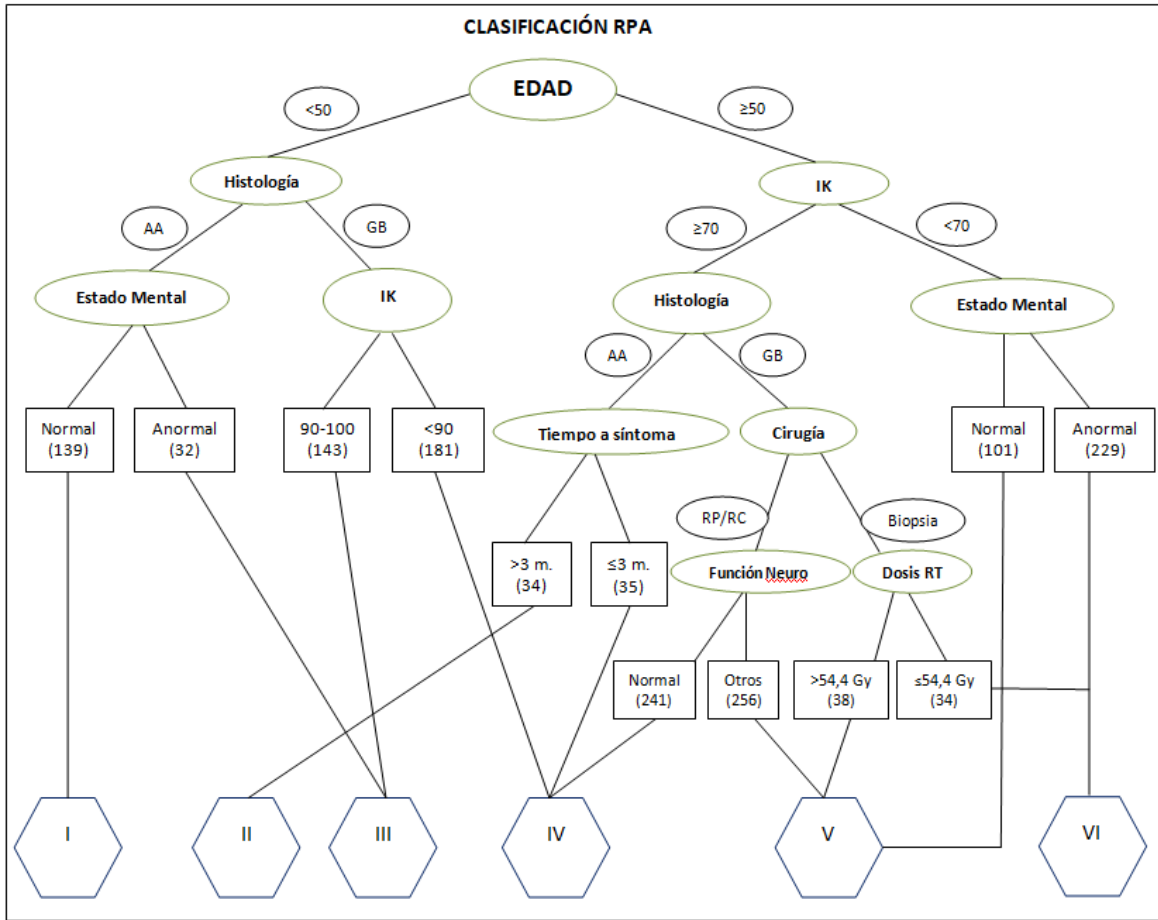


Figura 7. (Adaptada de(46)).Diagrama de la clasificación pronóstica de la RPA.

Abreviaturas: IK: Índice de Karnofsky. AA: Astrocitoma anaplásico. GB: Glioblastoma. RP: Resección parcial. RC: Resección completa. Neuro: neurológica. RT: Radioterapia. Gy: Grays.

Categoría (N)	Supervivencia mediana (meses)	Supervivencia a los 2 años
I (139)	58,6	76
II (34)	37,4	68
III (175)	17,9	35
IV (457)	11,1	15
V (395)	8,9	6
VI (263)	4,6	4

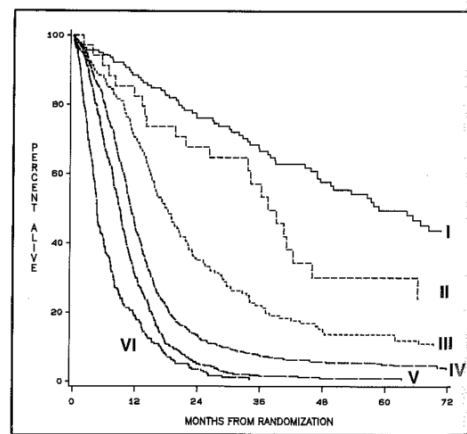


Figura 8 y tabla 7. (Adaptadas de (46)). Supervivencia según los grupos pronósticos de la RPA. N: número de pacientes

Esta clasificación fue posteriormente adaptada (RPA-EORTC, *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*), y validada para el tratamiento estándar (47). Actualmente, para el GB, se reconocen 3 clases diferentes (III, IV y V), según la edad, el estado general, el estado cognitivo (según el MMSE) y la resección tumoral, con pronóstico diferencial (Tabla 8, Figura 9).

Clase RPA-EORTC	Definición
III	Edad < a 50años PS=0
IV	Edad < a 50años PS=1 - 2 o Edad ≥ a 50años Resección completa/parcial MMSE ≥ 27
V	Edad ≥ a 50años MMSE < a 27 ó biopsia

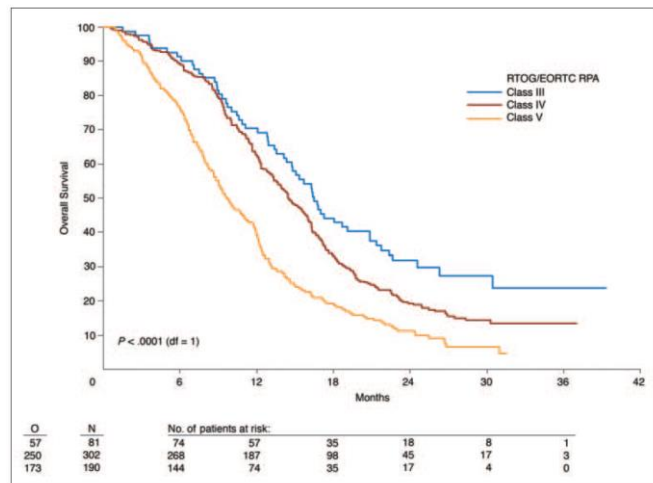


Tabla 8. Figura 9. (Extraídas de (47)). Clasificación según la RPA- EORTC y su impacto en la supervivencia.

A nivel molecular, la inactivación del gen *O-6-Metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT)*, por hipermetilación de su promotor, es un reconocido factor pronóstico independiente. Del mismo modo, es un predictivo de respuesta a tratamiento con alquilantes, como la temozolomida (TMZ) y otros fármacos del mismo tipo, usados en el tratamiento de los gliomas (6, 48-51). Siendo este marcador el objetivo del presente trabajo, con posterioridad, se ampliará este tema.

Para finalizar, la mutación de IDH también se ha correlacionado con el pronóstico, con un beneficio en la supervivencia en los pacientes con GB-IDHm (49). Mientras que el índice de proliferación celular (Ki67), y la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 10, podrían tener un impacto negativo en la supervivencia de los pacientes con GB (52).

1.1.5 Tratamiento

El GB requiere de un abordaje multidisciplinar, en el que intervienen neurocirujanos, especialistas en oncología radioterápica y en oncología médica.

El tratamiento inicial es la escisión quirúrgica, con intención de radicalidad. Su extensión está condicionada, principalmente, al tamaño tumoral, unicentricidad y a su situación o relación con áreas elocuentes. Estos motivos llevan a que, en ocasiones, sólo sea posible la realización de una biopsia que confirme el diagnóstico. Ello conlleva la posibilidad de que la muestra histológica obtenida no sea representativa del global del tumor, debido a la heterogeneidad del mismo y, por tanto, a un riesgo de error diagnóstico o en la determinación de marcadores moleculares. La naturaleza infiltrativa del GB, comporta que la resección completa curativa no sea factible. En el año 1888 Bramwell ya escribió sobre el dilema quirúrgico que planteaba este tumor, apuntando que, al no encontrarse encapsulado, era imposible determinar el margen entre tejido tumoral y normal sin un examen microscópico. Actualmente, técnicas como la RM con secuencias de neuro-navegación y la tractografía, se utilizan en la planificación prequirúrgica, para la valoración de la afectación secundaria al tumor y para reducir la posibilidad de lesión del tejido sano cerebral, como consecuencia del acto quirúrgico. Así mismo, en algunos centros, se dispone de herramientas intraquirúrgicas más novedosas, como son el ácido-5-aminolevulínico (5-ALA) (53), la monitorización neurofisiológica y el mapeo cerebral, para la localización de áreas elocuentes, (54) y la RM y los ultrasonidos intraoperatorios (55, 56). Así pues, los objetivos de la cirugía son la citorreducción, el alivio sintomático y la obtención de material histológico para el diagnóstico (3).

Estudios recientes señalan que una cirugía extensa no sólo mejora el estado neurológico del paciente y su supervivencia, sino también la eficacia de los tratamientos posquirúrgicos. Así pues, una cirugía amplia permite una mayor eficacia de la QTRT adyuvante (6, 57-61). El tema de la radicalidad quirúrgica ha creado controversia, debido al sesgo de los pacientes tratados con mayor agresividad quirúrgica. Ya que frecuentemente son pacientes más jóvenes, con mejor estado general y con tumores localizados en áreas menos elocuentes, factores que, individualmente, se asocian a un mejor pronóstico (62, 63).

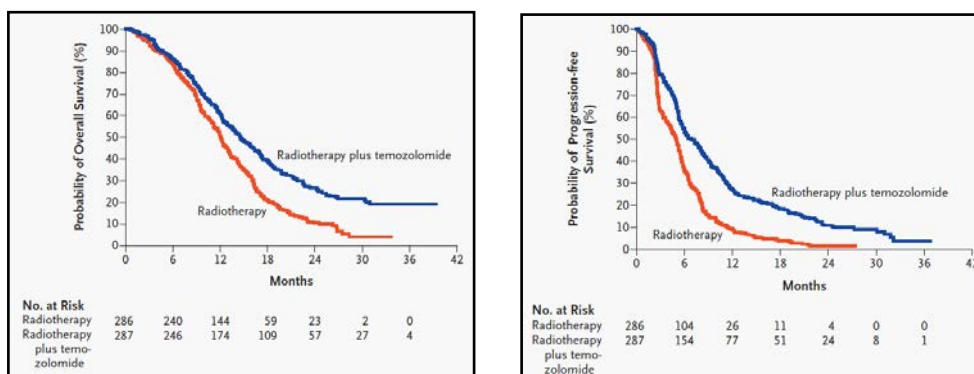
Teniendo en cuenta el mal pronóstico posquirúrgico de los pacientes intervenidos, incluso con una resección total, se iniciaron múltiples estudios en adyuvancia, con el fin de mejorar la supervivencia.

Seis ensayos clínicos aleatorizados apoyaron el uso de RT adyuvante (64, 65). La intensificación de dosis de RT, el uso de radio-sensibilizadores, la radiocirugía, o el hiperfraccionamiento, no ofrecieron mejores resultados, por lo que la RT focal a dosis de 60 Grays (Gy) se mantuvo como el estándar. Dado el discreto aumento en la supervivencia al añadir el tratamiento con RT, se siguió investigando distintos tratamientos quimioterápicos con los que combinarla.

El principal problema de la QT es la dificultad para atravesar la BHE y alcanzar niveles terapéuticos en el tumor. Únicamente los fármacos lipofílicos, como las nitrosoureas, o de muy bajo peso molecular, cumplen estas condiciones. Diferentes meta-análisis mostraron el impacto de sumar QT (con nitrosoureas) a la RT postoperatoria. El primero en publicarse, en 1993, utilizó datos de 16 estudios aleatorizados, comparando el tratamiento posquirúrgico con RT sola, frente a QTRT. El aumento de supervivencia a 1 año fue del 10,1% (95%IC; 6,8-13,3) (66).

Otro meta-análisis, en glioma de alto grado, objetivó un beneficio del 6% (95%IC 3-9) en supervivencia global (SG), con incremento de 2 meses, en pacientes a los que se les añadía adyuvancia con nitrosoureas, aumentando la supervivencia a 1 año hasta el 46% (67). No obstante, hasta el año 2004, no había un protocolo establecido sobre el tratamiento posquirúrgico, de modo que en la mayoría de casos se aplicaba únicamente RT adyuvante y en algún caso QT, sin un criterio estandarizado.

El primer estudio fase III publicado, en pacientes con GB, tratados de manera adyuvante con combinación de QT y RT, fue el de EORTC 26981-22981/NCIC (*National Cancer Institute of Canada*), liderado por Stupp (6, 7). En este ensayo clínico, se aleatorizaron pacientes (pc) diagnosticados de GB a recibir RT adyuvante sola o en combinación con TMZ. La TMZ es un fármaco citotóxico que actúa como agente alquilante, añadiendo un grupo alquilo en la posición O⁶ de la guanina y otro en la posición N. El esquema de RT utilizado fue de 2Gy 5 días a la semana, durante 6 semanas, con una dosis total de 60Gy. En el brazo combinado con TMZ, la dosis del fármaco, durante la concomitancia, fue de 75mg/m² diarios y, posteriormente, se añadían 6 ciclos de 28 días, a dosis de 150-200mg/m² durante 5 días. Los datos de SG demostraron un beneficio de 2,5m con el tratamiento combinado: 12,1 meses (95% IC; 11,2 - 13) versus (vs) 14,6 (95% IC; 13,2 - 16,8). El estado de metilación del promotor del gen *MGMT* fue la variable que mejor se correlacionó con el pronóstico. En las figuras 10 y 11 se presentan los datos de eficacia.



Figuras 10 y 11. (Extraídas de (6)). SG y supervivencia libre de progresión (SLP), en ambas ramas de tratamiento.

Los resultados del estudio de Stupp se ratificaron en un estudio fase II en el que, de igual modo, se aleatorizaron 130 pacientes a recibir RT adyuvante única o en combinación con TMZ (68). En este caso, la supervivencia libre de progresión (SLP) al año fue del 36,6% vs 7,7% en el grupo control, del mismo modo que la SG se incrementó en casi 6 meses (13,4m vs 7,7m; $p < 0,0001$). El impacto en supervivencia, del tratamiento con QTRT adyuvante con TMZ, junto con el buen perfil de toxicidad, condujo a cambiar la práctica clínica en pacientes de hasta 70 años, o mayores de 70 años con buen estado funcional.

Aparte de este esquema, reconocido hoy día como el estándar, se han investigado diferentes enfoques terapéuticos para el GB.

Uno de los tratamientos más novedosos e innovadores, en este campo, ha sido el uso de campos eléctricos para el tratamiento de tumores (TTFields), administrados mediante un dispositivo específico (Optune[®]) durante la adyuvancia con TMZ (69). Este tratamiento, se basa en el efecto antimitótico (parada de mitosis y apoptosis celular) de los campos electromagnéticos de baja intensidad y frecuencia intermedia (200kHz). Estas frecuencias se aplican, mediante un dispositivo, al cuero cabelludo. En un ensayo clínico, se trataron a los pacientes durante un mínimo de 18 horas al día, mediante unos transductores conectados a un mecanismo portátil. El estudio demostró un aumento en SLP de 4 a 6,7 meses (HR 0,63; 95%IC; 0,52-0,76; $p < 0,001$), frente a los pacientes tratados sólo con TMZ adyuvante. La SG también fue mejor en el grupo del tratamiento experimental (20,9 vs 16 meses. HR 0,63; 95%IC; 0,53-0,76; $p < 0,001$).

Diversos estudios fase III han comparado, de manera aleatorizada, el tratamiento estándar contra el mismo tratamiento más diversos fármacos, sin haber mejorado los resultados (70-72).

Otro de los abordajes, que se ha investigado en diversos ensayos clínicos, ha sido el tratamiento neoadyuvante (73-79). La estrategia pretende reducir el volumen tumoral, previo al tratamiento con QTRT, en pacientes con volumen tumoral considerable, en los que una resección completa no es posible y en los que el tratamiento combinado puede provocar una mayor toxicidad (debido a un campo de RT extenso y a la necesidad de mantener altas dosis de corticoides, para disminuir el edema).

El ensayo clínico GENOM 009, fue uno de los estudios que empleó dicha estrategia neoadyuvante, y se basó en la rapidez de la acción del bevacizumab (bev) para reducir el edema. En él, los pacientes se aleatorizaban a recibir, previamente al tratamiento con QTRT, dos ciclos de TMZ con o sin bev. Este estudio, del que se hablará detalladamente más adelante, es el ensayo del que proceden los datos y las muestras analizadas en el proyecto que se presenta en esta tesis (80).

El tratamiento en la población geriátrica ha sido objeto de estudio de forma individual. Es frecuente que éste subgrupo de pacientes quede poco representado o excluido de los ensayos clínicos, dato a tener muy en cuenta en un tumor cuya edad media al diagnóstico es de 64 años. Con el fin de intentar encontrar un tratamiento eficaz, minimizando la toxicidad, se han realizado diversos ensayos en pacientes mayores de 60 o 65 años con GB (48, 81, 82). En ellos, se ha aleatorizado a los pacientes a recibir diferentes esquemas de RT e, incluso, se ha comparado recibirla en combinación con TMZ o sin ella. Algunos han concluido que los pacientes con metilación del promotor de *MGMT* tienden a beneficiarse más del tratamiento con TMZ sola o en combinación con RT, al compararlos con RT sola. En ninguno de estos ensayos se aplicó una valoración geriátrica, herramienta que sí se usa en otros tumores.

1.1.5.1 Tratamiento sistémico en recurrencia

En el momento en que se produce la recurrencia tumoral, uno de los parámetros a evaluar para plantear la actitud terapéutica es si ésta es local o multifocal y el estado funcional y neurológico del paciente. En recaídas locales, se puede plantear un tratamiento focalizado como la reintervención o reirradiación, aunque pocas veces será factible ya sea por la dificultad técnica a causa de la localización, el tamaño tumoral o la imposibilidad de resección completa o por el estado general y neurológico del paciente. En los casos en los que se descarta un tratamiento local, la terapia de elección será el tratamiento sistémico.

A diferencia del tratamiento de primera línea, el beneficio de añadir tratamientos quimioterápicos posteriores es mucho más controvertido. Algunos de los fármacos que han demostrado actividad son los agentes cloroetilantes del DNA como la n-metil-hidracina (procarbina), la lomustina (CCNU), la metil-3-(2-cloroetil)-3-nitrosourea (nimustina o ACNU), la 1,3-bis (2-cloroetilo)-1-nitrosourea (BCNU), y la fotemustina. Este grupo de agentes causan citotoxicidad a través de la formación de O6-cloroetilguanina, la cual produce entrecruzamientos en el DNA. El enzima clave para evitar el daño celular, producido por estos fármacos, es la MGMT, ya que revierte parcialmente el daño causado en el DNA (83, 84). Otras terapias utilizadas son la vincristina, los dobletes con platino y el antiangiogénico bevacizumab en monoterapia o en combinación con QT (como el irinotecan o la lomustina) (42, 85-87).

Uno de los últimos avances, en el tratamiento de los pacientes con GB que recaen a las 16 semanas del último ciclo de TMZ adyuvante, es añadir depatuxizumab mafodotin al retratamiento con TMZ. Depatuxizumab mafodotin es un conjugado fármaco-anticuerpo compuesto por un anticuerpo monoclonal contra EGFR y un agente antimicrotúbulos. El tratamiento en combinación aumenta la SG en 4,7 meses (15,2m vs 9,5 meses para los pacientes tratados con TMZ en monoterapia). Este beneficio, está limitado al subgrupo de pacientes con GB que presentan amplificación del EGFR (88).

Dada la corta supervivencia de los pacientes, con las terapias disponibles en la actualidad, el desarrollo de nuevos fármacos es crucial. La investigación en la biología molecular y carcinogénesis de estos tumores es un punto clave para ello.

1.1.6 Biología molecular

La biología molecular es uno de los campos en auge dentro del estudio de los tumores del SNC, hasta tal punto que, como hemos visto anteriormente, la clasificación actual se basa en las alteraciones moleculares de genes y proteínas implicados en las principales vías de señalización de las células.

Algunos grupos, como el *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), han descrito aspectos fundamentales de las rutas biológicas implicadas en la evolución del GB y los tumores gliales de bajo grado (89). El proyecto TCGA es un programa multicéntrico coordinado, que aplica múltiples estrategias para analizar la genética y la epigenética del cáncer. El GB fue uno de los tumores más precozmente

estudiado a nivel de genoma y transcriptoma. En su informe inicial, el TCGA analizó el estado mutacional de 601 genes en 91 muestras de GB, la expresión génica, la metilación del DNA, el número de copias del DNA y los perfiles de expresión del RNA codificante y no codificante. Dicho estudio, proporcionó un mapa de las vías de señalización implicadas en el desarrollo y progresión del GB, siendo los genes de regulación del ciclo celular y los codificantes para factores de crecimiento, los más frecuentemente afectados.

Las tres vías principales en las que se determinaron alteraciones moleculares en el GB son las vías dependientes de los receptores tirosina quinasa, RTQ, (RAS y PI3K) y las vías de los supresores tumorales *RB1 (retinoblastoma)* y *TP53*.

La importancia en la activación de vías oncogénicas, como las que implican los RTQ, se ha demostrado en numerosos estudios preclínicos con ratones. La amplificación del gen *EGFR*, por ejemplo, se da en un 40% de GB y se traduce en una activación constitutiva de la vía. También se ha detectado amplificación de *PDGFR α* (factor alfa de crecimiento derivado de las plaquetas) en un 13% de GB y del proto-oncogén *MET* (factor de transición epitelio-mesenquima), aunque este segundo en menor frecuencia, ambos relacionados con la vía de señalización RTQ / RAS / PI3K. En este sentido, la activación de la vía PI3K- AKT-mTOR es también una anomalía común.

En la mayoría de GB (hasta en el 87% de GB), la función de p53 y Rb (78% de GB) es anormal, ya sea por mutaciones en el gen o alteraciones en el número de copias. Tanto p53 como Rb pueden alterarse indirectamente por vías como MDM2 (del inglés, *murine doble minute 2*), un inhibidor directo de p53 y CDK4 (quinasa dependiente de ciclina 4), que fosforila e inactiva Rb. Estas dos vías, a menudo, están reguladas por amplificación génica (89).

1.1.6.1 Alteraciones moleculares de especial relevancia en GB

El GB presenta una gran heterogeneidad biológica y ésta impacta tanto en su diagnóstico como en el pronóstico y la predicción de respuesta a los tratamientos.

Como se ha comentado previamente, el GB se ha dividido de manera tradicional en GB primario y secundario. Se define como primario (actual GB-IDHwt) aquel que no ha tenido un precursor conocido, mientras que el secundario es una progresión, en grado histológico, de un tumor de menor grado previamente sabido. Algunas de las alteraciones moleculares nos ayudan a

determinar esta diferencia. Así pues, la mutación del promotor del gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa (*TERT*), del fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa (*PTEN*) y los niveles elevados de algunos proto-oncogenes (como *EGFR*) son alteraciones que se encuentran en los GB primarios, mientras que las mutaciones en *IDH1-2*, *TP53* y *ATRX* son frecuentes en el GB secundario (11, 90). Estas tres últimas mutaciones, se consideran la base molecular, no sólo del GB secundario, sino también de la mayoría de los astrocitomas difusos y anaplásicos (91-93). La mutación de *TP53* se da especialmente en la variante de GB de células gigantes (94).

Las características moleculares diferenciales entre el GB-IDHwt y GB-IDHm se muestran en la figura 12.

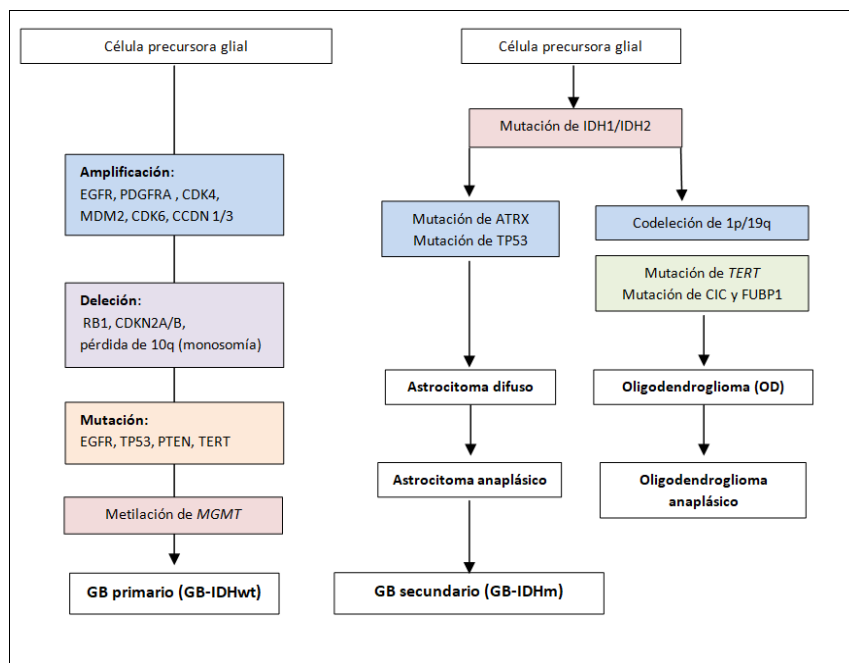


Figura 12. (Adaptada de (11)). Principales alteraciones moleculares en el GB primario y secundario.

Estas diferencias entre los GB-IDHwt y los GB-IDHm sugieren la posibilidad de que la pérdida de expresión de genes supresores de tumores sea un acontecimiento inicial en la gliomagénesis, mientras que la amplificación de oncogenes añade ventajas para el crecimiento y supervivencia en gliomas de alto grado, en fases más tardías de la tumorigénesis (95).

En las tablas que se presentan a continuación (Tabla 9, 10 y 11) se muestra la frecuencia de alteraciones en proteínas expresadas por oncogenes y genes supresores en GB, en comparación con otros tumores gliales.

Proteína expresada a la baja	Frecuencia en GB	Frecuencia en no-GB	p
pRB	34% (19/56)	37% (14/38)	No significativa
p16	63% (35/56)	42% (16/38)	0.06
p14 ARF	63% (35/56)	37% (14/38)	0.02
Pérdida de p53wt	38% (21/56)	66% (25/38)	0.01
PTEN	18% (10/56)	18% (7/38)	No significativa

Proteína sobreexpresada	Frecuencia en GB	Frecuencia en no-GB	p
EGFR	41% (23/56)	3% (1/38)	<0.0001
CDK4	25% (14/56)	3% (1/38)	0.0035

Frecuencia de sobreexpresión de proteínas en combinación con déficit de supresor tumoral		
GBM	no-GBM	p
73% (41/56)	11% (4/38)	<0.0001

Tabla 9, 10 y 11. (Adaptada de (95)). Diferencias en la frecuencia de expresión de proteínas en GB y otros tumores gliales.

A continuación, se resumen las principales alteraciones con relevancia especial en GB.

1.1.6.1.1 Mutación de IDH

La IDH es una enzima homodimérica que cataliza la conversión de isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG), con la consiguiente producción de CO₂ y NADPH (96). Las mutaciones de *IDH1* e *IDH2* se han detectado frecuentemente en gliomas, son mutuamente excluyentes y tienen como consecuencia la expresión de una proteína mutada. Estas mutaciones se limitan al exón 4, codón 132 en *IDH1* (la más habitual) y codón 172 en *IDH2* (97). IDH1 e IDH2 tienen un papel importante en diversas funciones celulares, como el metabolismo de la glutamina, la detección de niveles glucosa, la lipogénesis y la regulación de estado redox (reducción-oxidación) celular. IDH1 es la principal fuente de NADPH en el cerebro, protege del estrés oxidativo y del daño del DNA secundario (98).

En algunos tipos de tumores, como los gliomas de grado II-III o la leucemia mieloide aguda (LMA), es frecuente la aparición de mutaciones somáticas puntuales recurrentes en algunos residuos de IDH1 (Arg132) e IDH2 (Arg172, Arg140). Sorprendentemente, dichos mutantes se consideran mutantes de “ganancia de función”, que catalizan la conversión de α -KG en D-2-hidroxisuccinato (2-HG). Las proteínas mutante y no mutante (o silvestre) de IDH1 forman heterodímeros, de forma que el α -KG citosólico se metaboliza a 2-HG. El 2-HG incrementa la proliferación tumoral y la metástasis, a través de diferentes mecanismos que implican, entre otras, el incremento del estrés oxidativo, la metilación del DNA, la activación de ciertas vías de señalización, la estabilización del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1 α) o el incremento de la angiogénesis.

En la figura 13 se esquematiza la actividad enzimática de IDH silvestre (o wild type).

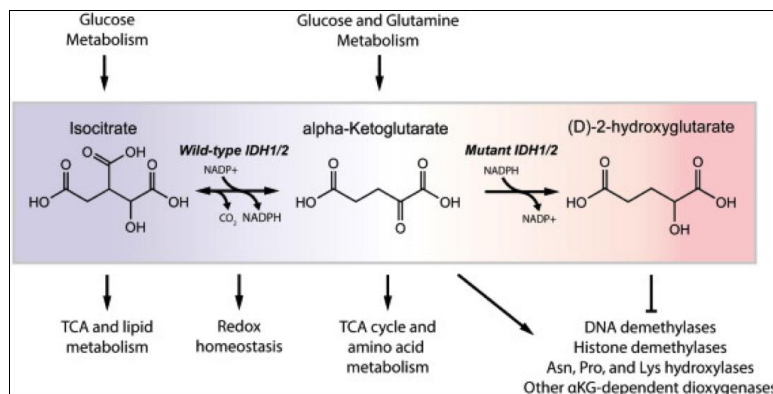


Figura 13. (Extraída de (99)). Reacción catalizada por IDH.

Los cambios epigenéticos asociados a la mutación de IDH definirán el fenotipo metilador de islas CpG o G-CIMP (glioma CpG island methylation phenotype), asociado con la metilación del genoma. Por otro lado, los GB con amplificación de *EGFR*, mutación de *PTEN* o amplificación del promotor de *TERT*, raramente presentan mutación en *IDH* (97) (Figura 14).

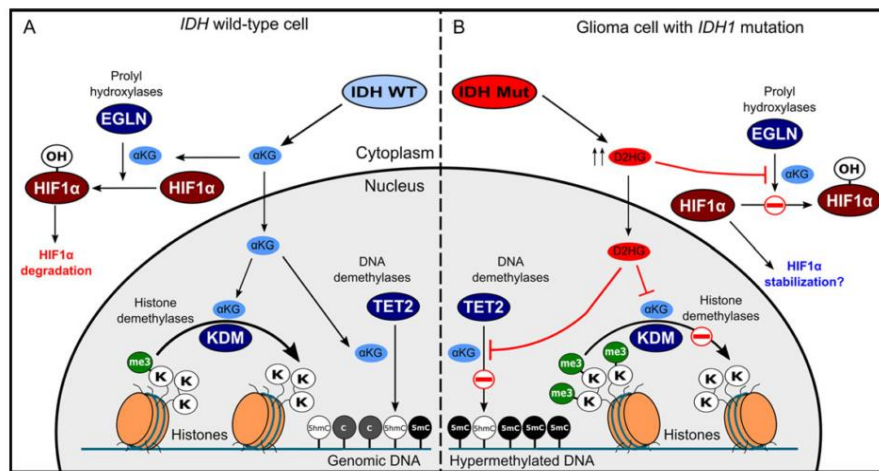


Figura 14. (Extraída de (96)). Funciones de IDH en una célula de glioma. A. Función de IDH normal B. Función de IDH mutado. Se muestra la inhibición de la degradación de HIF-1 α y la hipermetilación del DNA.

La mutación de IDH es un evento precoz en los gliomas (97). Su detección en GB secundarios es mucho mayor (85%) que en GB primarios (5%) y se ha observado una correlación entre la mutación de *IDH* y una menor edad al diagnóstico de GB (97). Su presencia en precursores de GB hace que se plantee como una diana interesante para el desarrollo de nuevos fármacos, y que, en la actualidad, se estén investigando inhibidores de IDH. Diversos estudios han demostrado una mejor supervivencia en pacientes con GB-IDHm (100).

1.1.6.1.2 Alteraciones de EGFR

La amplificación del gen *EGFR* es una alteración muy frecuente en gliomas de alto grado, presente hasta en un 17% de astrocitomas anaplásicos, aunque sobretodo hallada en GB (hasta en un 40%) (101). Actualmente, se considera diagnóstico de grado IV de malignidad. Esta amplificación, causa la sobreexpresión de la proteína. La sobreexpresión génica de *EGFR*, también puede deberse a la variante EGFRvIII, que contiene una delección entre los exones 2 y 7. Dicha variante, provoca la síntesis de un receptor truncado y activado independientemente del ligando, por lo que la célula se divide de forma incontrolada. La variante EGFRvIII se encuentra en un porcentaje mayor en los GB de células pequeñas (102). Su detección es característica de GB primarios, por lo que su análisis puede ser de utilidad en el diagnóstico.

En cuanto al valor pronóstico de la amplificación de *EGFR*, su presencia se ha relacionado con una menor supervivencia, aunque sin significación estadística. Asimismo, se le ha atribuido un posible impacto pronóstico, dependiendo de la edad del paciente, de modo que en mayores de 60 años, el pronóstico sería mejor que en pacientes más jóvenes (101, 103).

En la actualidad, el interés en esta molécula ha aumentado debido a su utilidad como diana terapéutica. En el contexto de ensayos clínicos, se están estudiando diversos fármacos que inhiben la amplificación de EGFR o EGFRvIII.

1.1.6.1.3 Mutación del promotor de *TERT*

La principal función de *TERT* es el mantenimiento telomérico. Los telómeros son regiones de DNA no codificantes, altamente repetitivas, situadas en los extremos de los cromosomas, que les confieren estabilidad. En cada división celular, se produce un acortamiento en su longitud y, con el tiempo, esto conduce a la muerte celular.

TERT también está implicado en fenómenos inflamatorios, interaccionando con NFκB y mediante la expresión de IL-6 y TNF-α (104). Las mutaciones del promotor de *TERT*, se han relacionado con el desenmascaramiento de los sitios de unión a factores de transcripción, que lleva a una sobreexpresión de *TERT* y a la promoción de su actividad telomerasa. Debido a que las células cancerígenas tienen la necesidad de mantener la longitud de los telómeros, durante los ciclos mitóticos, un aumento de la actividad de la telomerasa debería actuar facilitando la inmortalidad

celular y, por tanto, promoviendo la oncogénesis (105). Las alteraciones de *TERT* se pueden producir por mutaciones o por metilación de su promotor, aunque lo más frecuente son las mutaciones somáticas en el promotor. Dichas mutaciones, también se han descrito en otros tumores, como los melanomas, liposarcomas, hepatocarcinomas, carcinomas de tiroides y de vejiga y algunos tumores cerebrales(3).

La mutación de *TERT* es común en los gliomas, estando presente en la mayoría de OD y hasta en un 80% de los GB primarios, correlacionándose de manera inversa con las mutaciones de *IDH1/2* (106, 107). En la actualidad, al igual que la amplificación de *EGFR*, la mutación del promotor de *TERT*, en un glioma infiltrante astrocitario IDHwt, es criterio de grado IV de malignidad (14).

Algunos estudios indican que los pacientes con GB con mutación de *TERT* tendrían un peor pronóstico que los no mutados(106).

1.1.6.1.4 Metilación del promotor de *MGMT*

El gen *MGMT* codifica para la enzima O-6-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT), proteína con función reparadora del DNA, eliminando los grupos metilos de la posición O-6 que se han añadido a las guaninas (Figura 15). Su expresión se regula mediante la metilación del promotor. Dado que su función es necesaria para el funcionamiento fisiológico celular, en condiciones normales, el gen se encuentra activado.

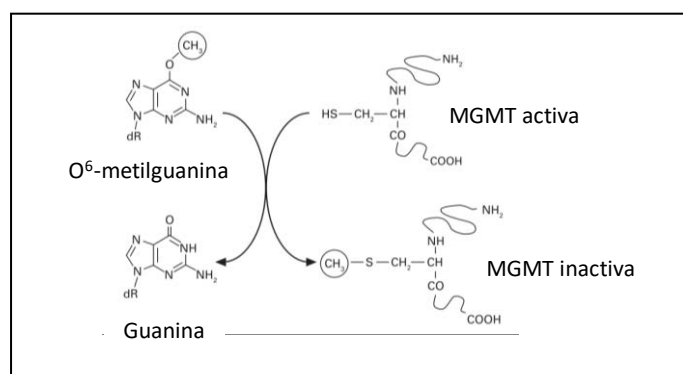


Figura 15. (Adaptada de (51)). Proceso de reparación del DNA mediado por MGMT. La transferencia del grupo metilo a la MGMT, la inactiva.

La pérdida de expresión de MGMT se produce, principalmente, por silenciamiento epigenético del promotor mediante su hipermetilación (108). La falta de expresión de *MGMT*, termina desencadenando un aumento del daño genético.

La metilación de *MGMT* se da en un 35-50% de los GB, estando más presente en los GB secundarios (75%) que en los primarios (45%) (109), y en relación a la pérdida de función de *IDH*. La mayoría de los gliomas con mutación de *IDH* son de fenotipo G-CIMP y, presentan metilación en múltiples genes, entre los que se incluye *MGMT*, aunque esta correlación no es total (110). La metilación del promotor de *MGMT* se ha considerado el biomarcador más potente en relación al pronóstico y la predicción de respuesta al tratamiento en GB (49). Posteriormente, en el apartado 2.2, se profundizará en el fenómeno de la metilación y se desarrollará más el tema de la metilación de *MGMT* en GB.

1.1.6.2 Subtipos transcriptómicos y epigenómicos del GB

Los estudios de perfiles de expresión génica, se han utilizado para clasificar a los GB, basándose en firmas transcripcionales. Según algunos autores, la información que se puede extraer de estas clasificaciones tiene impacto pronóstico y puede reflejar los patrones de mutaciones y las vías alteradas en cada subtipo (111).

Uno de los estudios más importantes, en gliomas infiltrantes, fue el realizado por Philips y colaboradores (112). En él, se estudiaron 35 genes en 76 muestras de gliomas de alto grado. Las muestras fueron divididas en 3 grupos diferentes, según su expresión de marcadores relacionados con el pronóstico. Los nombres que recibieron fueron: Proneural (PRN), proliferativo (PRL) y mesenquimal (MES). Cada uno de ellos, se definía por unos rasgos morfológicos, moleculares y clínicos (los más destacados se resumen en la tabla 12). El subtipo PRN, presentaba marcadores asociados con la neurogénesis, se daba en pacientes más jóvenes y tenía un mejor pronóstico. Por su parte, en el PRL se observaban marcadores de proliferación celular y en el MES de origen mesenquimal. Este último, se relacionaba con mayor angiogénesis.

	PRN	PRL	MES
Grado histológico	Grado III / IV con o sin necrosis	Grado IV con necrosis	Grado IV con necrosis
Morfología celular	Astrocítica u oligodendroglial	Astrocítica	Astrocítica
Edad del paciente	Joven (~40 años)	Mayor (~50 años)	Mayor (~50 años)
Pronóstico	Supervivencia larga	Supervivencia corta	Supervivencia corta
Proceso biológico	Neurogénesis	Proliferación	Angiogénesis
Alteración cromosómica	Ninguna	Ganancia de 7 Pérdida de 10 o 10q	Ganancia de 7 Pérdida de 10
PTEN	Intacta	Pérdida	Pérdida
EGFR	Normal	Amplificado o normal	Amplificado o normal
Vía de señalización	Activación de NOTCH	Activación de AKT	Activación de AKT

Tabla 12. (Adaptada de (111)). Principales características diferenciales de los 3 grupos transcriptómicos definidos por Philips.

El siguiente trabajo que se publicó fue el de Verhaak, analizando datos del TCGA en 200 casos de GB (113). Los genes utilizados no fueron escogidos específicamente según una correlación pronóstica, sino que se estudiaron los datos obtenidos en un estudio previo del TCGA, en 840 genes. En esta publicación, se diferenciaron 4 subtipos transcriptómicos de GB, llamados proneural (PRN-TCGA), Neural (NEU), mesenquimal (MES-TCGA) y clásico (CLS). Tres de estos 4 subtipos se relacionaron de manera significativa con alteraciones genómicas específicas. El PRN-TCGA presentaba mutación de *IDH1* y/o amplificación de *PDGFR α* , el MES-TCGA mostraba pérdida y/o mutación de *NF1* y, el CLS, amplificación y/o mutación en *EGFR* (Figura 16).

En lo que refiere a datos clínicos, el subtipo PRN-CTGA, a diferencia de los otros tres, parecía no beneficiarse de un tratamiento más intenso (QTRT o más de 3 ciclos de QT).

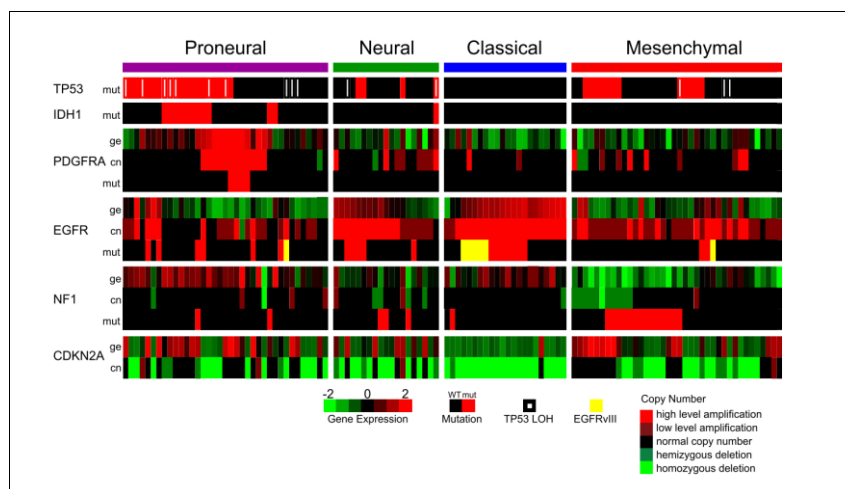


Figura 16. (Extraída de (113)). Expresión génica y alteraciones genómicas en los diferentes subtipos de GB. Las mutaciones se representan en rojo.

En resumen, las dos clasificaciones utilizaron diferente metodología, por lo que es complejo determinar el punto de coincidencia entre los subgrupos. No obstante, parece que los GB llamados mesenquimales se corresponden perfectamente y muchos de los casos proneurales también coinciden. La mayoría de los NEU pertenecerían al grupo de PRN, aunque algunos serían etiquetados como PRL. Los del grupo CLS, se separarían entre los diferentes subtipos. Posteriormente, se ha ido ampliando el conocimiento de estos subtipos, añadiendo características moleculares, variables clínicas y radiológicas, principalmente en los más definidos, el PRN y el MES.

El subtipo metilador merece mención aparte. Anteriormente, en el apartado de *IDH1*, se ha nombrado el subtipo G-CIMP. Este subtipo se definió en muestras pertenecientes al TCGA, al objetivar que determinadas muestras presentaban metilación en un alto número de genes (114). Comparando este subtipo con los previos, sugeridos por Verhaak, se observó que hasta un 87% de los G-CIMP coincidían con el subtipo PRN-CTGA. G-CIMP tiene una asociación con los tumores *IDHm*, de manera que todos los *IDHm* son GB G-CIMP y prácticamente todos los G-CIMP tienen *IDHm*.

1.2 El fenómeno de la metilación en el cáncer

La genética estudia la información transmitida en la secuencia de un gen y codificada por la propia secuencia de DNA. Por otro lado, la epigenética se dedica a la modulación de expresión de los genes y la estructura de la cromatina, mediante procesos químicos, sin alterar la secuencia de DNA (115).

Las principales modificaciones epigenéticas, para regular la expresión del DNA, son la metilación y la alteración de la estructura de la cromatina, mediante acetilación y metilación de las histonas. Esta última sucede alrededor de las regiones reguladoras de los genes, mientras que la hipermetilación lo hace, habitualmente, en zonas promotoras, es decir, en regiones de DNA que controlan el inicio de la transcripción. Ambos acontecimientos, están implicados en múltiples procesos fisiológicos y juegan un papel crucial en la tumorigénesis (116).

En mamíferos, la mayoría de DNA metilado se encuentra en el nucleótido citosina, de la pareja de nucleótidos que forma con guanina, mediante uniones por fosfato, conocidas como CpG (citosina

- fosfato - guanina). La metilación de la citosina de la CpG tiene lugar en su carbono 5', mediante la acción de las enzimas DNA metiltransferasas (DNMT) (117). Estos dinucleótidos no se distribuyen de una manera aleatoria en el genoma, sino que se concentran, principalmente, en regiones en las que se acumulan CpGs, llamadas islas de CpG. Se considera que el 70-80% de las 2.7×10^7 citosinas del genoma humano, localizadas en los dinucleótidos CG, están metiladas. Esta cifra corresponde, únicamente, al 3-5% de las citosinas del genoma humano (118).

En los tejidos normales, habitualmente, estas islas se encuentran no metiladas, y pueden ser útiles para señalar el inicio de un gen. En presencia de los factores de transcripción necesarios, si las histonas se encuentran acetiladas y no metiladas, ese gen en concreto se transcribirá (119). No obstante, esto no sucede siempre de este modo, sino que, en algunos escenarios fisiológicos, pueden hallarse islas CpGs metiladas. Este es el caso de procesos implicados en el desarrollo, como la inactivación del cromosoma X en el sexo femenino, el marcaje del genoma, los genes de línea germinal y los genes específicos de tejido (120).

La impronta del genoma o marcaje parental es la hipermetilación de DNA en un alelo, es decir, la inactivación de una de las dos versiones heredadas (paterna o materna) de un gen de línea germinal, con la consecuente expresión monoalélica (121). En mujeres, la hipermetilación se produce para inactivar genes de uno de los dos cromosomas X y así evitar redundancia. Lo mismo pasa en los genes que se expresan típicamente en línea germinal, pero no en la edad adulta, y para silenciar los genes característicos de las células de un tipo de tejido concreto.

Fuera de estas islas CpGs, y distribuidas a lo largo del genoma, también se encuentran dinucleótidos CpGs frecuentemente metilados. Así como la metilación en los promotores inhiben la expresión, su localización intragénica estabiliza la transcripción cuando dicho proceso ya se ha iniciado. La zona centromérica también es rica en CpGs metiladas, lo cual confiere estabilidad cromosómica (122). Del mismo modo, mantiene inactivos transposones, o secuencias provenientes de otras zonas del genoma, y de retrovirus endógenos, mediante la metilación de sus promotores (123, 124).

Todos estos patrones de metilación se mantienen, y regulan, por las DNA metiltransferasas. Estas enzimas se dividen en DNMT1, DNMT2 y DNMT3, teniendo este último subgrupo 3 miembros (3A, 3B y 3C). Así, las DNMT3 establecen los patrones de novo, las DNMT1 y 3B trabajan de manera

conjunta para el mantenimiento de las pautas de metilación, mientras que la DNMT2 actúa principalmente en los centrómeros (117).

El equilibrio epigenético perfecto de una célula normal, puede sufrir una dramática transformación en la célula cancerígena (115).

La primera observación de la alteración del DNA, en células malignas humanas, fue el hallazgo de una hipometilación global (121). Las células malignas, pueden presentar entre un 20 - 60% menos citosinas metiladas que su homólogo celular normal (125). Esta pérdida de grupos metilos sucede principalmente en las regiones codificantes de los exones e intrones de los genes, mediante la desmetilación de secuencias de DNA repetitivo. Esta hipometilación no está asociada con la sobreexpresión de oncogenes, tal y como se creía inicialmente, sino que se relaciona con tres mecanismos: la inestabilidad cromosómica, la reactivación de secuencias virales endógenas y transposones y la hiperegulación de genes por la pérdida del marcaje del genoma (125). El grado de hipometilación va aumentando durante la evolución del proceso de carcinogénesis, desde una proliferación benigna hasta el cáncer invasivo (126).

Por otro lado, la hipermetilación del DNA, también juega un papel en la tumorogénesis. La metilación de islas CpG, en la región reguladora de la expresión génica (promotora), de los genes supresores de tumores, o reparadores del DNA, provoca la condensación de la cromatina, impidiendo la transcripción del gen y su expresión (127, 128). El primer gen en el que se investigó este mecanismo fue el del retinoblastoma (*RB*), en 1989 (129). Posteriormente, se ha ido descubriendo la inactivación de otros genes supresores de tumores, implicados en diferentes aspectos del desarrollo celular (120). Estas diferentes facetas se pueden agrupar del siguiente modo, con algunos ejemplos de cada una:

- **Ciclo celular:** La hipermetilación en *p16 / RB / CDK4* permite a la célula salir de su senescencia e iniciar su proliferación.
- Genes implicados en la **vía de *p53*** (Vía de *p53/p14^{ARF}/MDM2*): Aunque *TP53* es el gen supresor más frecuentemente mutado en cáncer, en la mitad de tumores se encuentra en estado silvestre. Un modo indirecto de inactivarlo es mediante la metilación de *p14^{ARF}*. Así, la proteína oncogénica MDM2, al no estar inhibida por *p14^{ARF}*, puede degradar *p53* (130).

- **Vía APC/ β -catenina/E-caderina:** En el cáncer colorrectal esporádico, se ha objetivado la inactivación de *APC* debido a la hipermetilación de las islas de CpG de su promotor (125). Sucede del mismo modo en el promotor de e-caderina en relación al cáncer de mama (131).
- **Reparación del DNA:** La silenciación del gen reparador del DNA *MLH1*, en cáncer colorrectal esporádico, endometrio y gástrico, lleva a desarrollar el fenotipo de inestabilidad de microsátelites (132-134). La inactivación somática de *BRCA1*, en cáncer de mama y ovario, altera su papel reparativo sobre la rotura de doble cadena del DNA (135).
- **Respuesta hormonal:** La metilación de los receptores de estrógeno, progesterona y andrógeno (presente en tumores de mama, endometrio y próstata), puede implicar que las células tumorales no respondan al tratamiento con hormonas esteroideas (136-138).

En la figura 17 se esquematiza la función de la metilación del DNA en los procesos fisiológicos y patológicos.

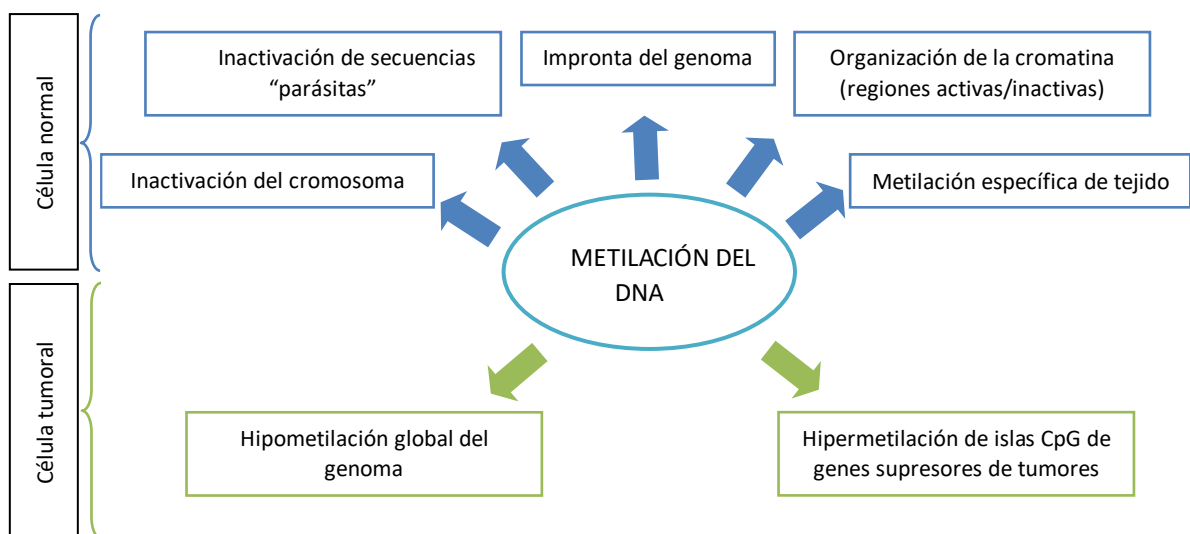


Figura 17. (Adaptada de (115)). La metilación del DNA como fenómeno fisiológico y patológico celular.

El conocimiento del patrón de metilación génica puede tener diversas aplicaciones prácticas, en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Por un lado, en los diferentes tipos de cáncer, se encuentran inactivados distintos genes. De hecho, parece que el patrón de metilación está fuertemente asociado a cada subtipo tumoral

concreto. Así, cada perfil de hipermetilación de islas CpG define una neoplasia, hasta el punto que se han desarrollado mapas de metilación, o metilomas, específicos para los diferentes cánceres (139, 140) (Figura 18). Este diferente patrón de metilación se ha intentado utilizar, por ejemplo, para la búsqueda del origen tumoral en tumores de origen desconocido (141).

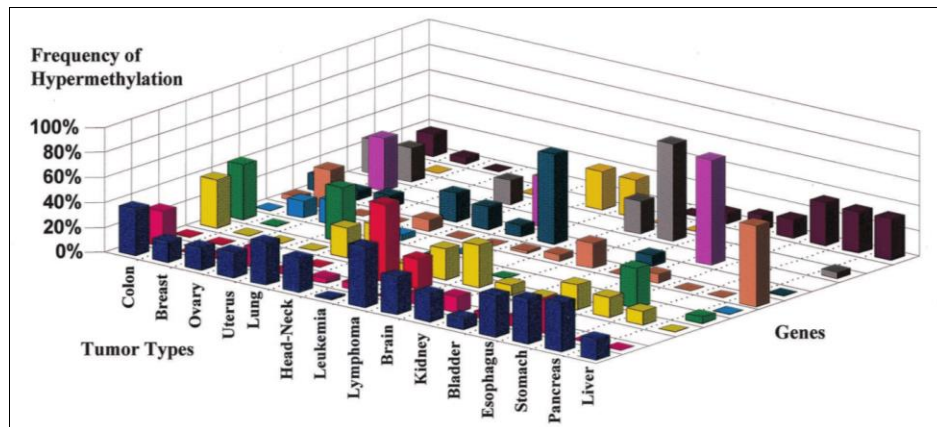


Figura 18. (Extraída de (139)). Perfil de la hipermetilación del promotor de diferentes genes, en diversas neoplasias.

La hipermetilación de los promotores de genes supresores de tumores, parece ser un evento temprano en la tumorigénesis. Algunas alteraciones, como la metilación de *APC* y *MGMT*, se han detectado en adenomas de colon, así como la metilación de *MLH1*, en hiperplasia atípica endometrial (120). En estos casos, la hipermetilación no sería signo de la presencia de un cáncer invasivo, sino de lesiones premalignas. Este hallazgo podría ser útil como cribaje, especialmente en familias de riesgo.

La estrecha relación entre la metilación y el cáncer ha llevado a investigar la manera de reactivar estos genes hipermetilados. El principal problema, que han tenido estos agentes, ha sido la falta de especificidad. Las terapias desmetilantes inhiben las DNA metiltransferasas, causando una hipometilación global. Este hecho no solo sería potencialmente dañino y tóxico para las células sanas, sino que también podría contribuir a una mayor inestabilidad cromosómica. Desafortunadamente, por el momento, no se ha conseguido reactivar únicamente algunos genes seleccionados (142) .

Otro de los aspectos importantes en la clínica, es la relación entre la inactivación génica por metilación y la eficacia de los tratamientos antineoplásicos. Por ejemplo, la respuesta a cisplatino podría estar relacionada con la metilación del promotor de *MLH1*; la respuesta a adriamicina, a la de *GSTP1*, y la respuesta a fármacos que inducen rotura de la doble cadena de DNA, a la de *BRCA1*.

El paradigma de la hipermetilación génica y su relación con la respuesta al tratamiento, es la metilación del promotor del gen *O⁶-Metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT)*, del que se hablará en el siguiente apartado.

1.2.1 La metilación del gen *MGMT* y su implicación en el GB

El gen de *O⁶-Metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT)* se localiza en el cromosoma 10q26, tiene 5 exones y un promotor de 762 pares de bases con 98 CpG. Estas CpGs, se localizan alrededor del punto de iniciación de la transcripción y comprenden dos regiones de metilación diferentes, las CpG 25-50 (región de metilación 1) y las 73-90 (región de metilación 2) (143).

La proteína MGMT tiene función reparadora del DNA, y su expresión se ha encontrado disminuida en diversos tumores, como los gliomas, linfomas, tumores de colon, tumores de cabeza y cuello y tumores de pulmón no célula pequeña. De hecho, en algunos tumores, su presencia es inexistente, por lo que se ha relacionado su expresión con el proceso de la carcinogénesis (144, 145).

La MGMT, de manera habitual, contrarresta los efectos citotóxicos de las sustancias alquilantes del DNA, como las provenientes de mutágenos del medio ambiente y del tabaco (146, 147). Las propiedades citotóxicas de estas sustancias, se han aprovechado para el desarrollo de fármacos quimioterápicos como la TMZ, lomustina, fotemustina o carmustina, utilizados en gliomas. Los grupos alquilo se unen al DNA, actuando, por ejemplo, sobre la O-6-guanina y causando un apareamiento anómalo con una timina (T), en vez de citosina (C). Esto conlleva la introducción de mutaciones en la replicación que, si no son reparadas, finalmente, desencadenan la apoptosis celular (148). Aunque ésta no es la única lesión del DNA inducida por estos agentes, parece ser la más citotóxica (109). La función de la MGMT es revertir esta alquilación.

El mecanismo utilizado para revertir esta alquilación, es la transferencia de un grupo alquilo de un oxígeno del DNA a un residuo de cisteína de la zona catalítica de la proteína MGMT. Como consecuencia, se restaura el DNA y la MGMT se inactiva, de manera irreversible, siendo finalmente degradada (83).

En la figura 19 se esquematiza la función de la MGMT y su impacto en la respuesta al tratamiento con alquilantes.

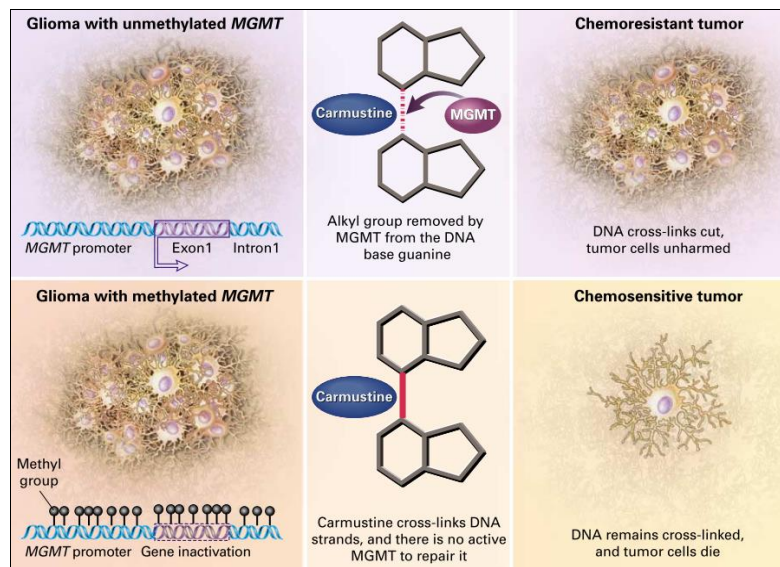


Figura 19. (Extraída de (149)). Mecanismo de sensibilización al tratamiento con quimioterápicos alquilantes, debido a la inactivación epigenética de *MGMT*.

El primer grupo que demostró el valor predictivo de la de O⁶-Metilguanina-DNA-metiltransferasa, en pacientes con glioma de alto grado tratados con un alquilante (carmustina), fue el de Esteller y colaboradores. (149)

Posteriormente, múltiples estudios han demostrado el valor de la hipermetilación del promotor de *MGMT* como factor pronóstico en gliomas de alto grado, tanto para la SLP como para la SG, y como factor predictivo de respuesta a terapias alquilantes (51, 109, 149-155).

La importancia de la regulación de la expresión génica de *MGMT*, mediante metilación, ha impulsado el desarrollo de múltiples técnicas para su detección.

1.2.2 Técnicas de detección de la metilación del promotor de *MGMT*

El análisis de la expresión de *MGMT* se lleva a cabo mediante el estudio de la metilación del promotor del gen. Esto es así, debido a que estudios que han cuantificado la expresión de *MGMT* en líneas celulares, o la actividad enzimática de la proteína, han demostrado una baja concordancia entre ellos (156). De hecho, los estudios mediante inmunohistoquímica han demostrado distintos patrones de expresión de *MGMT* en diferentes tipos celulares. Los linfocitos infiltrantes del tumor, la microglía, y los vasos sanguíneos, también pueden expresar *MGMT*, dificultando su valoración en el tumor (157-159) (Figura 20).

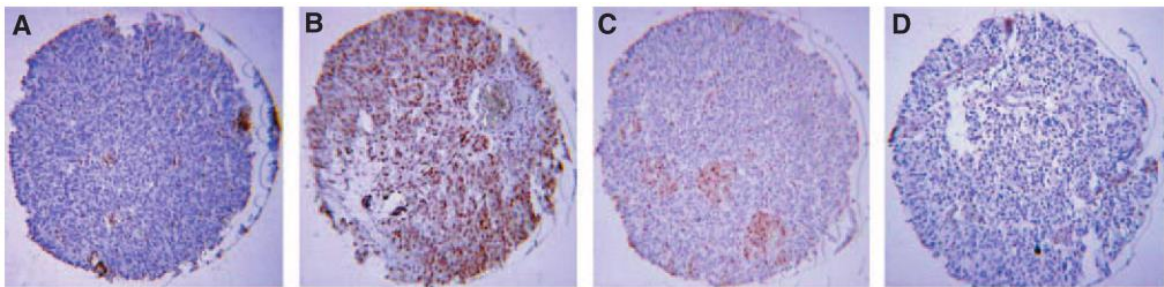


Figura 20. (Extraída de (51)). Expresión de *MGMT* en GB. **A:** Células con expresión de *MGMT*, sin poder determinar si su origen es tumoral o no. **B:** GB con expresión elevada de *MGMT* en la mayoría de sus células. **C y D:** Vasos sanguíneos.

Hoy día, existen múltiples técnicas para definir el estado de metilación del promotor de *MGMT* y no hay un consenso sobre cuál es la más adecuada y, por tanto, debería ser considerada la de referencia. El método ideal debería ser un método sensible, cuantitativo, reproducible, cómodo, rápido, eficiente, coste-efectivo y aplicable en la rutina clínica, es decir, en muestras de parafina o en sangre de pacientes.

La metodología aplicada, y el resultado obtenido con las distintas técnicas, radica básicamente en el fragmento de CpGs del promotor de *MGMT* analizado, y de si estas CpGs se estudian de manera individual o en conjunto. Todas las aproximaciones que se explican a continuación se basan en la PCR, ya que son las más ampliamente utilizadas y las que consiguen mejores resultados.

Para entender los diferentes métodos, y la información que nos muestra cada uno de ellos, es preciso comprender primero la naturaleza de las CpG analizadas. Las CpG del promotor de *MGMT* podrían encontrarse todas ellas metiladas o no metiladas, pero la realidad es que a veces forman

una mezcla heterogénea, en la que algunas de las CpG están metiladas y otras no. Este fenómeno se conoce como “metilación parcial”. La figura 21 plasma este concepto de una manera muy visual, en la que cada secuencia con metilación variable se llamará “epialelo”.

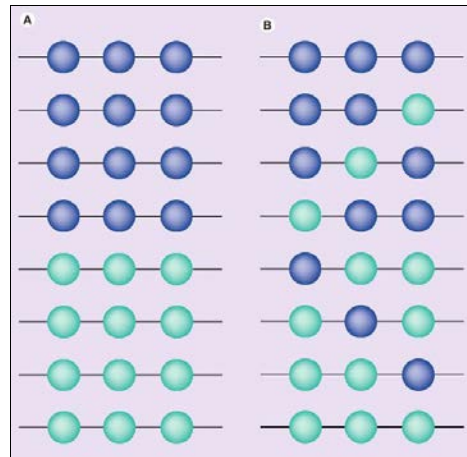


Figura 21. (Extraída de (160)). Representación de la heterogeneidad en la metilación. Los grupos **A** y **B** representan dos extracciones de DNA diferentes. Cada línea representa un epialelo con 3 CpGs. Los círculos verdes representan CpGs no metiladas y los azules, metiladas. **A:** Mezcla de epialelos completamente metilados con no metilados. **B:** Epialelos con diferentes combinaciones de metilación en las distintas CpG.

La mayoría de las técnicas para detectar la metilación se basan en la amplificación por PCR del DNA, que previamente ha sido modificado con bisulfito. La modificación con bisulfito convierte a las citosinas en uracilos, mientras que aquellas que estén protegidas con una metilación permanecerán intactas (Figura 22). Dicho proceso conduce a que dos secuencias que sólo se diferencian por sus metilaciones, se conviertan en dos fragmentos distintos y que, por tanto, den lugar a productos de amplificación diferentes (amplicones).

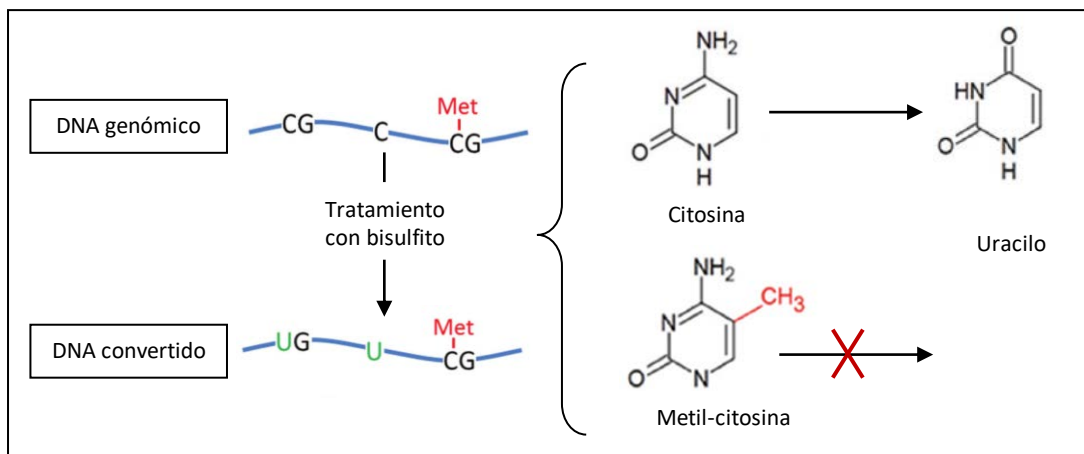


Figura 22. (Adaptada de (161)). Esquema del tratamiento con bisulfito.

Según estas premisas, los test más usados para el análisis de metilación se pueden agrupar en 4 grandes grupos, dependiendo del tipo de cebadores empleados en la PCR y del procedimiento (160).

El primero (grupo A) está compuesto por los métodos basados en la amplificación de secuencias específicas, según el estado de metilación del DNA. Utiliza cebadores que se unen sobre las CpG a analizar, de tal modo que una pareja de cebadores se unen a las secuencias totalmente metiladas (C no convertidas) e, independientemente, otra pareja a las secuencias totalmente no metiladas (C sustituidas por U). Este tipo de técnicas, llamadas también “específicas de metilación”, no serán capaces de discriminar secuencias heterogéneas o parcialmente metiladas. La reacción en cadena de la polimerasa específica para metilación (MSP) forma parte de este grupo. Este método se ha considerado de referencia hasta el momento, y con él se han realizado la mayoría de estudios sobre la correlación entre la metilación del promotor de *MGMT* y la supervivencia.

La figura 23 muestra el modo de análisis de estas técnicas.

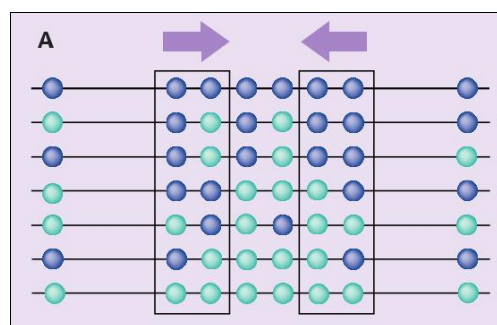


Figura 23. (Extraída de (160)). Grupo A. Lectura utilizando cebadores específicos de metilación. Los cebadores sólo se unirán en las regiones completamente metiladas o no metiladas, pero no a las metiladas parcialmente.

Los siguientes tres grupos (B, C y D) comprenden métodos que pueden diferenciar entre secuencias metiladas, no metiladas o parcialmente metiladas, utilizando cebadores independientes del estado de metilación. Para ello, los cebadores utilizados hibridan en zonas flanqueantes a las CpG a analizar.

El grupo B (Figura 24), aprovecha las propiedades químicas/físicas de los diferentes amplicones generados en la PCR. Dentro de este grupo se encuentra el análisis de alta resolución de fusión (HRM). Con este método, por ejemplo, se determina la temperatura de desnaturalización de los amplicones, que será diferente si su composición es más rica en C que si lo es en U.

Los amplicones parcialmente metilados, con mezcla de C y U también serán diferenciables, aunque no podremos dar un valor de metilación por CpG, sino uno global.

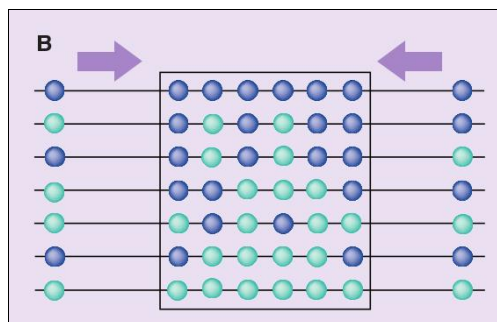


Figura 24. (Extraída de (160)). Grupo B. Amplificación de todo el fragmento con cebadores independientes. Se valoran todas las CpG conjuntamente.

Forman parte del grupo C, aquellas metodologías que analizan la metilación de diferentes CpGs del amplicón generado en la PCR, de manera individual. Entre éstas se hallan la pirosecuenciación y la secuenciación directa. El nivel de metilación de cada posición CpG se obtiene como una media de la metilación (en porcentajes) de todos los epialelos presentes en la muestra (rectángulos verticales en figura 25).

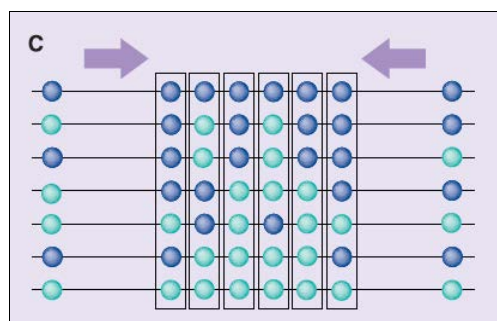


Figura 25. (Extraída de (160)). Grupo C. Lectura de cada posición de CpG de manera individual, obteniendo un resultado promedio.

El último y cuarto grupo (D), analiza el estado de metilación de productos de PCR de manera individual (Figura 26) (160). La secuenciación genómica de clones por bisulfito es una de las técnicas que forma parte de este grupo.

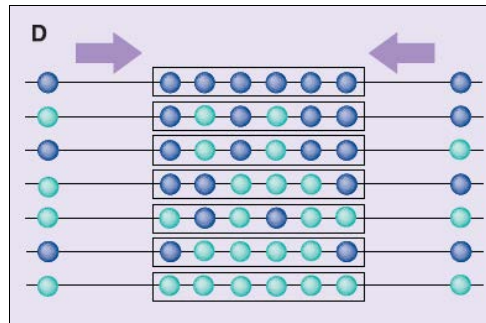


Figura 26. (Extraída de (160)). Grupo D. Lectura individual de cada uno de los alelos.

A continuación, se desarrollará en mayor detalle la “secuenciación genómica de clones por bisulfito”, por su particular relevancia en el establecimiento de la metilación diferencial de las posiciones de las CpGs. Debido a su interés en la práctica clínica y por tratarse de las técnicas de estudio en el presente trabajo, también se ampliará información sobre la MSP y la pirosecuenciación.

1.2.2.1 Secuenciación genómica de clones por bisulfito

Fue el primer método utilizado basado en PCR y permitió cuantificar, independientemente, cada CpG del promotor de *MGMT* y obtener un mapa global de las más frecuentemente mutadas en dicho gen, de distintas líneas celulares. Esta tecnología se basa en la amplificación del promotor de *MGMT* y la clonación de cada amplicón producido en la PCR. El DNA de cada uno de estos clones se puede secuenciar y, así, determinar su estado de metilación. Posteriormente, para cada CpG se puede obtener un porcentaje de metilación en esa muestra, integrando los resultados de todos los amplicones por separado (Figura27). En la figura 28 se muestra un esquema de la técnica.

Sus limitaciones son el coste y el tiempo que se requiere para el proceso de clonación (160). Así, aunque es una técnica de gran utilidad en la investigación, no es una técnica coste-efectiva para el diagnóstico clínico.

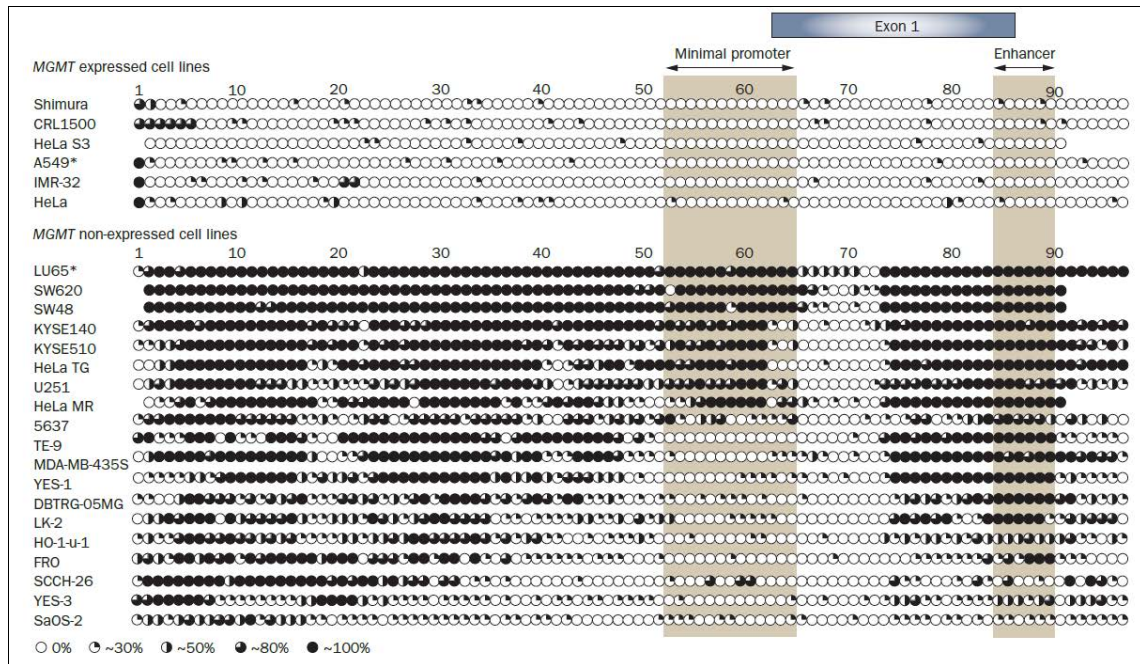


Figura 27. (Extraída de (109)). Se detalla la metilación de la isla de CpGs del promotor de *MGMT*, en líneas celulares con expresión y con no expresión de *MGMT*. Cada círculo es una CpG y en él representa el porcentaje de metilación de los clones (clones metilados/10 clones analizados x 100), en una posición determinada de CpG.

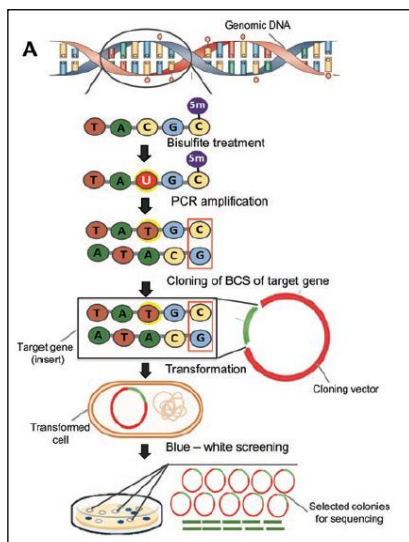


Figura 28. (Extraída de (162)). Esquema de la secuenciación de clones por bisulfito. Se resumen los pasos: 1) El DNA se modifica con bisulfito 2) Los fragmentos de interés se amplifican por PCR 3) Estos fragmentos se clonan, amplificados en un vector, y se transforman en una célula de *E.coli*.

1.2.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa específica para metilación (MSP)

La MSP fue descrita por primera vez en 1996, analizando la metilación de E-caderina, p15, VHL y p16 (163), y establecida por Esteller y colaboradores (149).

Consiste en el diseño de cebadores específicos, para su unión a secuencias metiladas (cebadores A) o no metiladas (cebadores B), tras la conversión de éstas con bisulfito. El DNA se amplifica por PCR con estas parejas de cebadores, en tubos en paralelo, y el resultado se analiza en un gel de agarosa o acrilamida, mediante electroforesis.

El resultado que se obtiene es binario. En el caso de que todas las CpGs de la isla, a las que se une el cebador, sean metiladas, obtendremos una banda con la pareja de cebadores A. La intensidad de ésta no se correlaciona con el grado de metilación, sino que es un resultado cualitativo. Si la isla CpG está desmetilada, no se obtendrá banda con los cebadores A, pero sí con los B. En consecuencia, si una o más CpGs son no metiladas, no hay aparición de banda en la electroforesis, por lo que no se detectará una metilación parcial (164). La principal desventaja de esta metodología radica en esta incapacidad de amplificar secuencias parcialmente metiladas.

Más recientemente, se han añadido diferentes marcajes o sondas a los cebadores para hacer más sencillo su análisis. Así, por ejemplo, añadiendo un marcaje fluorescente a los cebadores se pueden evaluar en un analizador de fragmentos.

El principal error derivado de esta técnica, se produce en la conversión con bisulfito, ya que una conversión incompleta de citosinas no metiladas a uracilo puede generar falsos positivos, que no son detectados (165). Aunque se trata de un método relativamente simple, requiere de un DNA de buena calidad.

1.2.2.3 Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es un método de secuenciación, es decir, un método que determina la secuencia de bases de una cadena. Está basada en el principio de “secuenciación por síntesis” (166, 167), en el que la secuenciación se realiza determinando el nucleótido incorporado por una DNA polimerasa; y en la detección del pirofosfato (PPi) que se libera en esa unión, de ahí su nombre (168). En el proceso, se utiliza una cascada de cuatro enzimas que transformarán el PPi liberado, en luz. Esta señal será proporcional al número de moléculas de PPi, cuanto mayor sea el número de nucleótidos incorporados, mayor será su amplitud.

El esquema general de esta metodología es el siguiente:

- Amplificación de las secuencias a analizar.
- Hibridación del producto de la PCR desnaturalizado (molde), con un cebador de secuenciación biotinilado.
- Aislamiento de la cadena biotinilada hibridada con el cebador.
- Adición de nucleótidos según un orden predeterminado. El primer desoxirribonucleido trifosfato (dNTP) se añade a la reacción. En caso de ser complementario con la cadena molde, la DNA polimerasa cataliza la incorporación del dNTP a la cadena del DNA, liberándose una molécula de PPi, en cantidad equimolar a la de nucleótido incorporado (Figura 29).

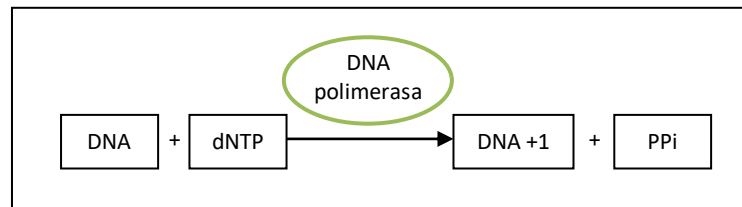


Figura 29. Reacción catalizada por la DNA polimerasa.

- La ATP (Adenosina trifosfato) sulfurilasa convierte el PPi en ATP, en presencia de adenosina 5 fosfosulfato (APS). Este ATP, dirige la conversión de la luciferina en oxiluciferina, mediante la luciferasa, emitiendo luz visible en cantidad proporcional al ATP generado. Esta luz, se detecta por un dispositivo acoplado y traduce la información en forma de un pico. La altura de cada pico (señal luminosa) es equivalente al número de nucleótidos incorporados (Figura 30).

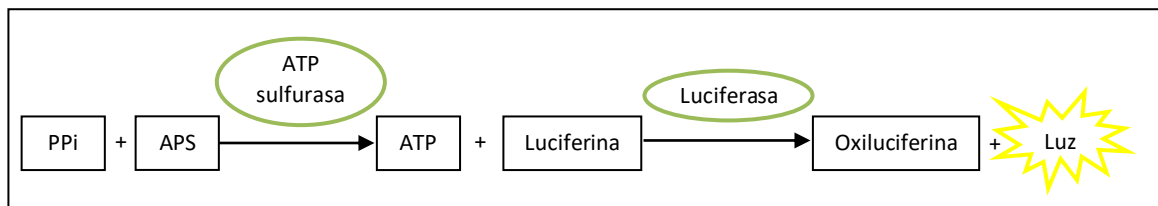


Figura 30. Reacciones catalizadas por la ATP sulfurasa y la luciferasa.

- La apirasa degrada los nucleótidos no incorporados y el ATP.
- El proceso se repite añadiendo el siguiente dNTP, y así sucesivamente, según la secuencia de dispensación predefinida.

La secuencia de picos obtenidos recibe el nombre de “pirograma”, donde en el eje de las X se representa el dNTP que se añade y en el de la Y la intensidad de luz generada tras su adición.

Cuando se determina la metilación con esta técnica, lo que se obtiene es una proporción entre las cadenas que tienen una C en una CpG determinada, respecto a las que tienen una U, después de la conversión con bisulfito. Es, por tanto, un método semicuantitativo que nos da la proporción de una con respecto a la otra. Permite el estudio de diferentes CpGs al mismo tiempo, aunque cuantificándolas independientemente.

1.3 La biopsia líquida en gliomas

El término “biopsia líquida” fue introducido por primera vez en 2010, haciendo referencia a las células tumorales circulantes halladas, en sangre periférica, de pacientes con cáncer (169). Hoy día, el concepto engloba a múltiples líquidos biológicos, como la sangre, la saliva, la orina, el líquido céfalo-raquídeo (LCR) y el líquido pleural, en los que podemos detectar diversos biomarcadores (Figura 31).

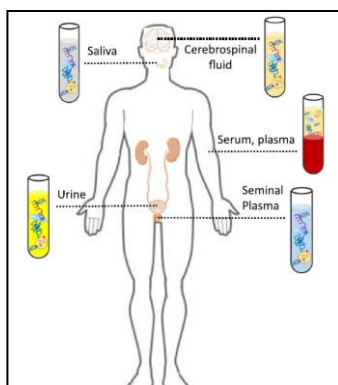


Figura 31. (Extraída de (170)). Fluidos biológicos en los que se pueden detectar moléculas circulantes.

Un biomarcador se define como una herramienta analítica, que se puede medir objetivamente y evaluar como indicador de un proceso biológico, un proceso patogénico o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (171). Podemos distinguir tres subcategorías: marcadores diagnósticos, es decir, aquellos que identifican la presencia de una enfermedad; pronósticos, aquellos usados para conocer el resultado independientemente del tratamiento y predictivos, aquellos que nos informan de la evolución de la enfermedad en el contexto de una terapia concreta. Bioquímicamente, pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, metabolitos y células tumorales (172).

Resumidamente, las aplicaciones del uso de la biopsia líquida como fuente de biomarcadores son: el diagnóstico precoz, el análisis de la heterogeneidad molecular del tumor global y su evolución, la identificación de alteraciones genéticas sobre las que poder actuar farmacológicamente, la evaluación de una respuesta precoz, la monitorización de la enfermedad mínima residual y el análisis de la evolución de resistencias a las terapias en tiempo real (173).

En el caso de los gliomas, su caracterización genómica es crucial. Por un lado, tal y como se ha comentado previamente, su nueva clasificación (OMS 2016) integra la histología y el análisis genético, por lo que es un dato necesario para el diagnóstico. Por otro lado, las alteraciones genéticas tienen implicaciones terapéuticas y pronósticas.

La monitorización durante el tratamiento es una necesidad en los pacientes afectados de glioma. La valoración de la respuesta a una terapia se ha hecho clásicamente con pruebas de imagen. El problema surge cuando la prueba de imagen no es concluyente, por ejemplo en casos de pseudorespuesta o pseudoprogresión. Así como algunas neoplasias tienen marcadores tumorales detectables en sangre, como el PSA, CA 125 o CEA, que pueden ayudar a la valoración del volumen tumoral, los gliomas carecen de ellos.

Por consiguiente, durante todo el curso de la enfermedad, pueden surgir situaciones en las que el único modo de obtener la información sería mediante la extracción de nuevo material histológico, con una biopsia. En el caso de los gliomas, la realización de una biopsia tiene riesgos añadidos. Su localización anatómica, el edema peritumoral y el riesgo de hemorragia, aumentan la complejidad de obtener una nueva muestra de tejido tumoral. Por este motivo, múltiples grupos han intentado buscar una alternativa no invasiva, mediante la detección de biomarcadores en líquidos biológicos, es decir, lo que se ha denominado como “biopsia líquida”.

Diferentes biofluidos han sido motivo de estudio en gliomas. Debido a que el cerebro está impregnado por él, el LCR se ha postulado como uno de los líquidos más adecuados para el análisis genómico en tumores cerebrales (174, 175). La baja concentración proteica en el LCR, en una situación fisiológica (100-400 veces menor que la del suero), permite detectar con rapidez un escenario patológico. La rotura de la barrera hemato-encefálica, la secreción intratecal o la diseminación desde el sistema nervioso central altera o incrementa la fracción proteica del LCR. No obstante, su extracción mediante una punción lumbar, comporta unos riesgos que conlleva que no sea el líquido más indicado para utilizar en el seguimiento de los pacientes.

La sangre también ha sido estudiada para identificar cambios epigenéticos en tumores y, en concreto, en el glioma (155). La facilidad en la obtención de una muestra sanguínea hace que sea un fluido atractivo para analizar, no sólo en el diagnóstico, sino también para la monitorización. Se ha descrito la detección de DNA tumoral en sangre, así como su uso para el análisis de variaciones en microsatélites, mutaciones y alteraciones epigenéticas (155, 176-178).

A continuación, se desarrollan los diferentes biomarcadores que se han utilizado para la detección de estas alteraciones en los líquidos biológicos.

1.3.1 Células tumorales circulantes (CTCs)

Aunque el término de células tumorales circulantes (CTCs) parezca muy novedoso, en 1869 ya se refirieron datos sobre la presencia de células neoplásicas en sangre, en un paciente con cáncer (179).

Las CTCs se pueden aislar en la sangre periférica de pacientes con tumores sólidos, en una proporción de 1-10 CTCs por cada 10mL de sangre. Su presencia ha mostrado una buena correlación con la respuesta tumoral, supervivencia libre de progresión y supervivencia global (180-184). Del mismo modo, tienen un papel importante para representar la heterogeneidad tumoral, ya sea la propia heterogeneidad intratumoral o la que podemos encontrar entre el tumor y sus metástasis.

No obstante, dada su escasa representación en sangre, es crucial el uso de una técnica adecuada para su detección. Tradicionalmente, el método más utilizado ha sido la captura mediada por anticuerpos. Esta técnica se basa en la positividad, en las CTCs, del marcador epitelial EpCAM y de la ausencia de expresión de CD45 (marcador de linfocitos) (185). Aunque se han obtenido buenos resultados en tumores sólidos, parece que en tumores no epiteliales, como el glioma, es difícil determinar una proteína de membrana específica tumoral (186). No obstante, se han utilizado paneles de proteínas de membrana para intentar identificar CTCs específicas de GB. Uno de los estudios analizó alteraciones genéticas específicas de los diversos subtipos transcriptómicos de GB (de Philips y Verhaak). Las CTCs que se aislaron, presentaban características mesenquimales (como TGF β 1), corroborando su fenotipo invasivo (187). Estrategias basadas en la actividad de la telomerasa que poseen las células tumorales (y no las normales), también se han utilizado para aislar CTCs en sangre de pacientes con GB (188).

Resulta interesante corroborar que se pueden hallar CTCs, en sangre de pacientes con GB, aunque estos tumores se presentan, en la mayoría de casos, con ausencia de metástasis en otros órganos. El porqué estos tumores, aun diseminándose a distancia, no formen metástasis, es un hecho que sigue sin tener explicación. Algunas investigaciones sugieren que esto se deba a que el GB pueda necesitar de algún factor de crecimiento neuronal que se encuentre exclusivamente en el cerebro (187). Así, aún encontrándose CTCs en sangre, éstas no pueden proliferar.

Los nuevos avances se basan en diferenciar las CTCs del resto de células circulantes normales, a nivel de DNA, RNA o proteína, mediante distintas tecnologías (microchips, filtrado, técnicas de PCR, citometría de flujo, secuenciación...) (189). Otro método utilizado para su separación, ha sido el enriquecimiento a través de la eliminación del resto de componentes sanguíneos no deseados (selección negativa). En este sentido, se ha utilizado la lisis de eritrocitos y separación por gradiente de densidad o la eliminación de leucocitos usando cargas magnéticas (190, 191).

1.3.2 Vesículas extracelulares

El concepto de “vesícula extracelular” abarca a los exosomas (30-100nm diámetro), las microvesículas (100-500nm) y las vesículas apoptóticas (>500nm) (192). Estas vesículas son liberadas por células normales, o tumorales, al microambiente celular o a los fluidos biológicos y llevan en su interior gran variedad de moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y metabolitos) representativas de sus células originarias (172). Su estabilidad y envoltura membranosas, protege su contenido de nucleasas, proteasas y otras enzimas de degradación, que se encuentran en el medio extracelular (193). Por tanto, las microvesículas de células tumorales transportan firmas moleculares, como fragmentos de oncoproteínas mutantes, transcritos oncogénicos, microRNA y secuencias de DNA específicas de la célula de la que provienen. De ahí su utilidad como biomarcadores.

En los pacientes con glioma, se han encontrado vesículas circulantes en líquidos biológicos como la sangre y el LCR. Algunas de las moléculas aisladas en estas vesículas han sido el EGFRvIII, EGFR, VEGF, PDGFR α , podoplanina (PDPN), PTEN, miR-21 y RNA-mensajero (mRNA) de IDH1 mutante (194-196).

En exosomas obtenidos de la sangre de pacientes con GB, se han detectado niveles bajos de genes con funciones ribosomales (197), mientras que se han hallado elevadas algunas proteínas relacionadas con la angiogénesis y algunos microRNA (195, 198). Estas determinaciones se han correlacionado con el diagnóstico de GB, con una elevada sensibilidad y especificidad.

La EGFRvIII también se ha detectado, en microvesículas, de muestras sanguíneas de pacientes con GB. Incluso, se ha descrito su positividad en sangre aún siendo la biopsia de tejido negativa, dando prueba de la heterogeneidad tumoral (195). Del mismo modo, se ha observado la desaparición de la expresión de EGFRvIII después de la cirugía del tumor primario, validándose su valor como biomarcador evolutivo (195). Parece ser que su detección en exosomas en sangre tiene mayor sensibilidad que en LCR (82 vs 61%), mientras que la especificidad es mayor en este último (79 vs 98%) (199, 200).

En conclusión, las moléculas transportadas en las vesículas extracelulares aisladas en líquidos biológicos, de pacientes con GB, pueden dar detalles que ayuden a su diagnóstico y en la monitorización de los cambios inducidos por el tratamiento (194, 195, 201).

1.3.3 Proteínas

Debido a que no se han identificado proteínas específicas tumorales, este enfoque se basa en detectar, en biofluidos, proteínas fisiológicas en niveles anormales (201).

La proteína más estudiada en gliomas es la proteína glio-fibrilar ácida (GFAP), un filamento intermedio altamente expresado en células gliales. Múltiples estudios han objetivado niveles elevados de ésta en GB (202-204). Los puntos de corte de la concentración en sangre de esta proteína para el diagnóstico de tumores cerebrales, varían en los diferentes estudios. Así pues, niveles de GFAP superiores a 0,05 µg/ml permitían diagnosticar un glioma maligno con una especificidad del 100%, mientras que la sensibilidad era mejor (85%) con niveles entre 0,01 µg/ml y 0,014 ng/ml (202-204). La GFAP también se ha correlacionado con el grado y volumen tumoral, de modo que podría ser útil como factor predictivo (202).

EGFR también se ha detectado en sangre de pacientes con GB, en niveles superiores a los de individuos sanos, relacionándose el valor encontrado con la supervivencia (205). Por otro lado, niveles elevados de YKL-40 y MMP-9, en sangre, se han relacionado con un peor pronóstico (206).

En LCR también se ha analizado GFAP, de manera que niveles superiores a 0,04 µg/ml diferencian pacientes con tumores en SNC de personas sanas (207). De igual modo, la proteína básica de la mielina (MBP) también se encuentra en pacientes con GB en niveles superiores a 4ng/ml, correlacionándose con la actividad neoplásica, con una reducción después del tratamiento (208). También el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la interleuquina 6, el 2-hidroxisulcatato, la histidina y el triptófano se han encontrado elevados en el LCR de estos pacientes (209-211).

1.3.4 microRNA circulante (miRNA)

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de cadena simple de RNA no codificante, formadas por unos 21-25 nucleótidos, que modulan la expresión postranscripcional de genes. Controlan la traducción del mRNA a proteínas, mediante la degradación de mRNA o por la inhibición de su iniciación (212). Los miRNA están implicados en múltiples procesos celulares, como son el desarrollo, la apoptosis, la proliferación y la diferenciación. Estas funciones han hecho que se hayan relacionado con distintos cánceres, incluido el glioma, en los que actúan como supresores de tumores u oncogenes (213). Así como el mRNA es rápidamente degradado por las RNAsas de la sangre, los miRNA no sólo son resistentes a estas enzimas, sino que también son fácilmente detectables en líquidos biológicos (214). Estos hallazgos han hecho crecer su interés como potenciales biomarcadores diagnósticos, pronósticos o predictivos.

Datos publicados sobre miRNAs, en LCR, han mostrado que algunos miRNAs pueden ayudar a diferenciar entre una lesión cerebral metastásica y un GB. Por ejemplo, miR-200, está únicamente elevado en pacientes con metástasis cerebrales, mientras que los niveles de miR-10b y miR-21 lo están en pacientes con GB (215). Además, miR-223, miR-451 y miR-711, en LCR, pueden usarse para distinguir un GB de otros tumores del SNC (216). Así pues, diversos miRNA en LCR han demostrado utilidad, no sólo en diferenciar metástasis cerebrales de GB, sino también GB de otros tumores del SNC. A pesar de estos estudios publicados, no se ha examinado la especificidad y sensibilidad de los miRNA en LCR en comparación con otros biomarcadores.

Los miRNA se detectan en sangre de pacientes con GB de forma diferencial a los controles sanos (217). Así sucede, por ejemplo, con miRNA-205, miR-210, miR-320, let-7g-5p y miR-7-5P (218, 219).

1.3.5 DNA tumoral circulante (ctDNA)

La utilidad del DNA circulante se publicó, por primera vez, en el 1948, por Mandel y Metais, al referir su presencia en individuos sanos y enfermos, y se ha utilizado en múltiples disciplinas médicas (220). En el caso de la oncología, sabemos que las células tumorales, al entrar en apoptosis, liberan su contenido intracelular, incluido el DNA tumoral circulante (ctDNA) (221, 222). Este DNA tumoral, se mezcla con el de las células no neoplásicas y se diferencia de éste último por las alteraciones genéticas que presenta. Así, por ejemplo, ha permitido el análisis de la pérdida de heterocigosidad (LOH), las variaciones en microsatélites y las mutaciones y alteraciones epigenéticas, como la metilación de genes supresores de tumores (155, 176, 177, 223, 224).

En la figura 32 se esquematiza la liberación de ctDNA en la sangre y las múltiples alteraciones genéticas que pueden encontrarse, como son: las mutaciones puntuales, la variación en el número de copias, los reordenamientos y los patrones de metilación (173).

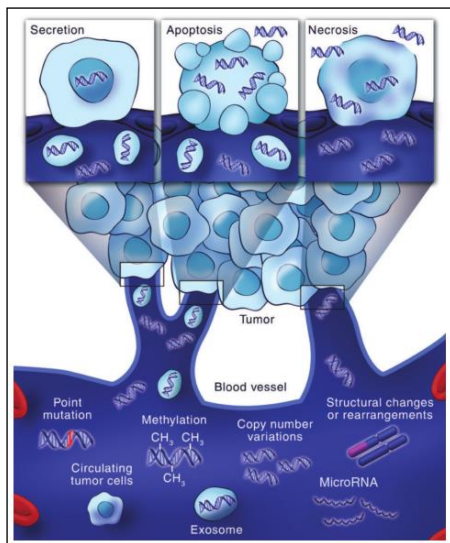


Figura 32. (Extraída de (173)). Liberación de diversos biomarcadores en sangre.

La detección de ctDNA en sangre presenta algunos retos claros. El primero de ellos, es su baja concentración en sangre. Se ha descrito que en la mayoría de personas sanas, las concentraciones de DNA circulante estarían por debajo de 50ng/ml, mientras que en pacientes con cáncer, la media sería de 180+/- 38ng/ml ($p < 0.005$) (178). Otros investigadores, han detectado únicamente una cantidad de 10ng/ml, siendo este número mayor en pacientes con cáncer metastásico (225). Aunque estas cantidades publicadas varían en un rango muy amplio, globalmente, se estima que el ctDNA representaría menos del 1% del total de DNA circulante

(226-228). La siguiente dificultad, es su discriminación del DNA circulante no patológico y la cuantificación de las mutaciones en los pequeños fragmentos que componen el ctDNA (173). Estos retos implican la necesidad de la optimización de los métodos de extracción del DNA y su detección (186).

A pesar de estos inconvenientes, hay estudios que han podido demostrar una correlación entre variantes específicas tumorales, aisladas en plasma, y la supervivencia en pacientes con cáncer metastásico (229). Estos datos indican que, probablemente, la concentración de ctDNA en sangre tenga relación con el volumen de enfermedad oncológica (230). Es decir, a mayor diseminación del cáncer, mayor capacidad de detectar ctDNA en sangre. Del mismo modo, la cantidad de ctDNA detectable en líquidos biológicos sería diferente en diferentes tipos tumorales (229).

En pacientes con glioma de alto grado se ha detectado una mayor concentración de ctDNA en plasma al compararse con controles sanos o pacientes con glioma de bajo grado. Este hecho puede deberse a la ruptura de la BHE. Así pues, en gliomas de bajo grado, la BHE, al permanecer intacta, limita la difusión de pequeñas moléculas de DNA a la corriente sanguínea (231).

Otros estudios, han analizado el ctDNA en el LCR de pacientes con tumores cerebrales, hipotetizando que la mayor concentración de ctDNA en éste, en comparación con la de la sangre, podría reducir la tasa de falsos negativos. De hecho, se ha publicado que, aunque la concentración de ctDNA es menor en LCR que en suero, la concentración de ctDNA específico mutado es mayor en LCR (230, 232). Mutaciones en *EGFR*, *PTEN*, *ESR1*, *IDH1*, *ERBB2* y *FGFR2* se han encontrado en ctDNA de LCR, con una sensibilidad del 58% (232), mientras que en genes de las histonas H3 también se han detectado con una sensibilidad del 87,5% y una especificidad del 100%, al validarse por inmunohistoquímica y secuenciación de Sanger (174). Algunos datos indican que el ctDNA no se encuentra en el LCR de todos los tumores cerebrales, de modo que su utilidad podría limitarse a los tumores de alto grado (233).

En la tabla 13 se resumen algunas de las características de los biomarcadores mencionados, en comparación con el tejido.

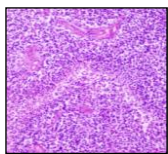
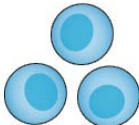
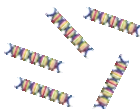
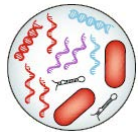

	Tejido 	CTCs 	ctDNA 	Vesículas extracelulares 	miRNA 
Origen					
Células viables	Sí	Sí	No	Sí	Desconocido
Células apoptóticas	Sí	Sí	Sí	Desconocido	Desconocido
Componentes					
DNA	Sí	Sí	Sí	Sí	No
RNA	Sí	Sí	No	Sí	Sí
Proteínas	Sí	Sí	No	Sí	No
Metabolitos	Sí	Sí	No	Desconocido	No
Información extraíble					
Mutaciones	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Alteraciones en número de copias	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Alteraciones epigenéticas	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Genes de fusión	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Variantes de empalme	Sí	Sí	No	Sí	No
Información a nivel celular	Sí	Sí	No	No	No
Ensayos funcionales	Sí	Sí	No	No	No
Aplicaciones en oncología de precisión					
Pronóstico	Sí	Sí	Sí	Sí	Posiblemente
Identificación de marcadores predictivos	Sí	Sí	Sí	Posiblemente	No
Clasificación molecular	Sí	Posiblemente	Posiblemente	Desconocido	No
Seguimiento de la evolución clonal	No	Sí	Sí	Desconocido	No
Identificación precoz de mecanismos de resistencia	No	Sí	Sí	Posiblemente	No
Monitorización de respuesta al tratamiento	No	Posiblemente	Sí	Posiblemente	Desconocido
Detección precoz de recurrencia y EMR	No	Posiblemente	Sí	Posiblemente	No
Detección precoz del cáncer	No	Posiblemente	Posiblemente	Posiblemente	Desconocido

Tabla 13. (Adaptada de (234)). Comparación entre los distintos biomarcadores hallados en biopsia líquida y el tejido. Abreviaturas: EMR: Enfermedad mínima residual.

1.3.5.1 La metilación de MGMT en ctDNA

Nuestro grupo fue el primero en publicar la detección de metilación del promotor de *MGMT*, en ctDNA de muestras sanguíneas de pacientes con GB, así como de p16, DAPK y RASSF1A (155). La metilación del promotor del gen, en sangre, fue pronóstica y predictiva de respuesta al tratamiento con BCNU. Posteriormente, otros estudios han demostrado la detección de la metilación del promotor de *MGMT* en ctDNA y de los promotores de otros genes, como p16, p14, p73 y RAR β (176, 223, 224).

CONTEXTO DE LA TESIS. EL ENSAYO GENOM 009

2 CONTEXTO DE LA TESIS. EL ENSAYO GENOM 009

El ensayo clínico GENOM009, fue un ensayo del grupo GEINO (grupo español de investigación en neuro-oncología) en el que participaron 18 centros españoles (80). En este estudio, se incluyeron 102 pacientes con GB irreseccable, diagnosticado únicamente con biopsia y se aleatorizaron a recibir dos ciclos de neoadyuvancia con TMZ (rama A), previo a un tratamiento estándar con QTRT y adyuvancia con TMZ (esquema Stupp (6, 7)), o a realizar el mismo esquema añadiendo Bev en neoadyuvancia y durante los 30 días de la concomitancia (rama B). Se recopilaron muestras, de tejido y sangre de los pacientes, para el análisis de metilación del promotor de *MGMT*.

El objetivo principal fue la tasa respuesta, según el investigador (criterios RANO) (44) y los objetivos secundarios fueron la SLP, la SG y el valor predictivo de la metilación del promotor de *MGMT*, en tejido y en suero. El esquema utilizado en la rama A consistía en 85mg/m² de TMZ desde el día 1 al 21, en ciclos de 28 días, y, posteriormente, concomitancia con TMZ 75mg/m²/d y RT (dosis total de 60Gy durante 42 días con fracciones de 2Gy/d). En la rama B, se administraba el mismo tratamiento, añadiendo Bev 10mg/kg los días 1 y 15, de cada ciclo neoadyuvante, y los días 1, 15, 30, durante la concomitancia. Después del tratamiento combinado con QTRT, se suspendía el tratamiento en ambas ramas, durante 28 días, y se reanudaba la adyuvancia con TMZ hasta completar 6 ciclos (Figura 33).

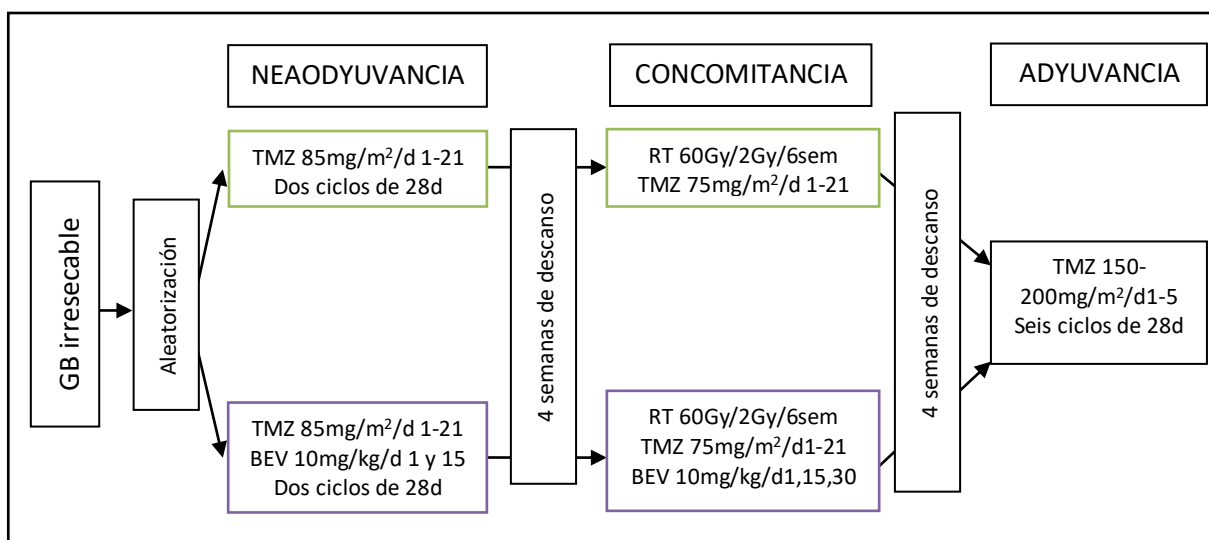


Figura 33. Diseño del ensayo clínico GENOM009.

Se extrajeron los datos epidemiológicos y descriptivos de las historias clínicas y se recopilaron las muestras tumorales de tejido parafinado y de sangre (suero / plasma) de los pacientes, para la revisión patológica y análisis de metilación del promotor de *MGMT* con MSP, en nuestro centro. Los datos de eficacia (tasas de respuesta, SLP y SG) ya fueron publicados, así como también lo son los resultados del estudio de metilación del tejido, por MSP, que resumiré a continuación.

De los 102 pacientes registrados, se recopilaron 81 muestras de tejido en parafina y 83 muestras sanguíneas. El análisis del estado de metilación del promotor de *MGMT* se pudo determinar en 73 de las 81 muestras de tejido, es decir, en el 90,1% de muestras analizadas, y en 74 de las 83 muestras en sangre, 89,2% de las analizadas. Globalmente, 50 pacientes se tuvieron resultados pareados de sangre y tejido. El análisis de sangre y de tejido se realizó por dos investigadores diferentes, de manera ciega.

De todas las muestras estudiadas mediante MSP, no todas obtuvieron un resultado válido, ni todos los pacientes con muestra iniciaron el tratamiento dentro del ensayo clínico. Los resultados se muestran en la tabla 14.

	Rama TMZ (N=45)	Rama TMZ+BEV (N=48)	p
	N (%)	N (%)	
MGMT en tejido			
Resultado válido	30 (66,7)	37 (77,1)	
Metilado	12 (40)	20 (54,1)	0,18
No metilado	18 (60)	17 (45,9)	
MGMT en sangre			
Resultado válido	33 (73,3)	38 (79,1)	
Metilado	3 (9,1)	8 (21,1)	0,25
No Metilado	30 (90,9)	30 (78,9)	

Tabla 14. Resultados de los casos valorables, incluidos en el ensayo clínico. N: Número de pacientes.

Cabe destacar que, aunque los datos de eficacia (SLP y SG) fueron superiores en los pacientes con metilación del promotor del gen *MGMT* en tejido (SLP 5,8 vs. 2,2m; HR 0,31. 95 %IC 0,18–0,55. $p < 0.001$; SG 13,3m vs. 5,3m; HR 0,40. 95%IC 0,24-0,68. $p = 0,001$), los resultados en sangre no tuvieron impacto en la supervivencia y la concordancia entre los resultados de tejido y sangre fue baja.

Como se ha comentado, en este estudio inicial, la técnica usada para determinar el estado del promotor de *MGMT* fue la MSP. Los datos obtenidos en nuestra cohorte tenían dos incongruencias, en relación a lo observado en la práctica diaria, y a lo descrito en la literatura. Por un lado, no se demostraba el valor pronóstico de *MGMT* en las determinaciones sanguíneas y por otro, los resultados entre los dos tipos de muestra (tejido y sangre) tuvieron una concordancia baja.

A raíz de estos resultados, surge la idea de un nuevo proyecto y el motivo de esta tesis, con intención de discernir si, otra técnica, podría detectar más casos con metilación del promotor de *MGMT*, en las muestras de tejido y de sangre. La pirosecuenciación ofrece una rápida evaluación del estado de metilación de la *MGMT*, con una elevada especificidad y sensibilidad (165, 235) y con buena relación coste-efectividad (236-238). Por estos motivos, se eligió su uso para este estudio.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Nuestra hipótesis es que, en los pacientes afectados de GB, la pirosecuenciación podría detectar un mayor número de muestras de sangre y tejido, con metilación del promotor del gen *MGMT*, que la MSP.

El proyecto plantea que el uso del ctDNA, hallado en sangre en pacientes con GB, sería un buen biomarcador para el análisis de la metilación del promotor de *MGMT*, por pirosecuenciación y MSP.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo principal

1. El objetivo principal de este estudio fue determinar, en pacientes con GB, la metilación del promotor del gen *MGMT*, mediante la técnica de pirosecuenciación, en muestras pareadas de tejido y sangre (suero y plasma), y compararla con los resultados obtenidos mediante MSP.

3.2.2 Objetivos secundarios

Los objetivos secundarios fueron los siguientes:

2.1 Analizar el valor predictivo y pronóstico de la metilación del promotor del gen de *MGMT* en GB, mediante su determinación por pirosecuenciación y MSP, en tejido y sangre.

2.2 Comparar, de manera pareada, los resultados de ambas muestras (tejido y sangre) con una misma técnica. Es decir, tejido frente a sangre mediante MSP y tejido frente a sangre mediante pirosecuenciación.

2.3 Valorar la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo negativo y el valor predictivo positivo, de ambas técnicas.

2.4 Definir el punto de corte, con relevancia clínica, para determinar el valor de la metilación de *MGMT*, mediante pirosecuenciación.

METODOLOGÍA

4 METODOLOGÍA

4.1 Selección de casos. Pacientes y muestras

Los casos y muestras utilizados en este proyecto proceden del ensayo clínico GENOM 009. Las muestras parafinadas de tejido tumoral y las sanguíneas se mandaron a nuestro centro (centro principal), posteriormente al registro de los pacientes (Figura 34). Se realizó una revisión centralizada, de los diagnósticos, para confirmar que todas las muestras eran de GB.

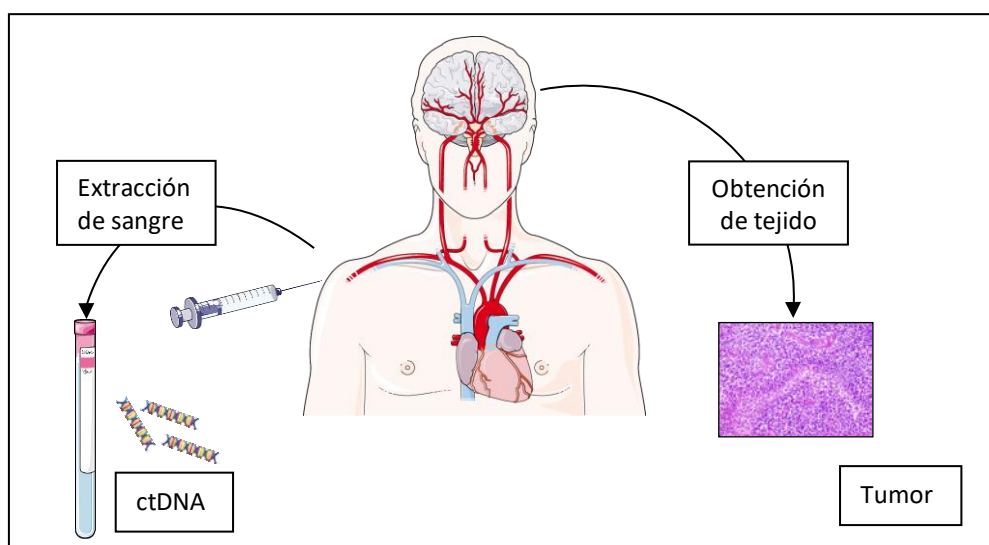


Figura 34. Muestras obtenidas de los pacientes.

Únicamente 93 pacientes, de los 102 registrados, iniciaron el tratamiento dentro del ensayo GENOM 009, 45 para recibir TMZ y 48 para recibir TMZ más Bev. Así pues, aunque en nuestro estudio se determinó el estado de metilación de *MGMT*, por pirosecuenciación, en todas las muestras recopiladas, sólo se pudo analizar la SG, la SLP y las tasas de respuesta en aquellos pacientes con seguimiento dentro del ensayo. Al ser pacientes incluidos en un ensayo clínico, tanto los datos identificativos, como las muestras, estaban anonimizados, y los participantes habían firmado un consentimiento informado general y uno específico para el análisis molecular. El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Las variables estudiadas se tomaron de las ya existentes en la base de datos (edad, sexo, fecha de cirugía, tipo de cirugía, MMSE, IK (o PS), estado de metilación de *MGMT* en tejido y sangre (realizado mediante MSP), tratamiento recibido, tipo de respuesta al tratamiento, fecha de progresión y de éxito o último control. Con esta información, se realizó el estudio demográfico, de respuesta al tratamiento, de SLP y de SG.

Los casos estudiados, en el presente trabajo, se seleccionaron por tener remanente de tejido tumoral y/o muestra de suero y/o plasma, para realizar la determinación del estado de metilación de *MGMT*, mediante pirosecuenciación. Hay que destacar que ya en el estudio inicial, con MSP, no se pudo disponer de ambas muestras en todos los pacientes y en este segundo estudio algunas de las muestras ya se habían agotado.

Aparte de las muestras de tejido tumoral, se analizó el porcentaje de metilación de *MGMT* en muestras no tumorales: tejido cerebral normal, tejido de colon y células sanguíneas (linfocitos).

4.2 Análisis de metilación del promotor de *MGMT* mediante pirosecuenciación

A continuación se expone, de forma esquemática, el proceso desarrollado en cada una de las muestras (Figura 35). Hay que tener en cuenta que en el caso del tejido, inicialmente, se empezó utilizando el DNA extraído y convertido con bisulfito, sobrante del primer análisis. Si las muestras no obtenían un resultado valorable con la nueva técnica y se tenía tejido almacenado, se iniciaba el proceso completo desde la extracción del DNA de las muestras almacenadas. En caso de tener DNA extraído, se realizaba la conversión previa a la PCR. Para las muestras de sangre (suero o plasma), al tratarse de un material genético más inestable, se realizó todo el procedimiento desde el primer paso (extracción del DNA) en todos los casos.

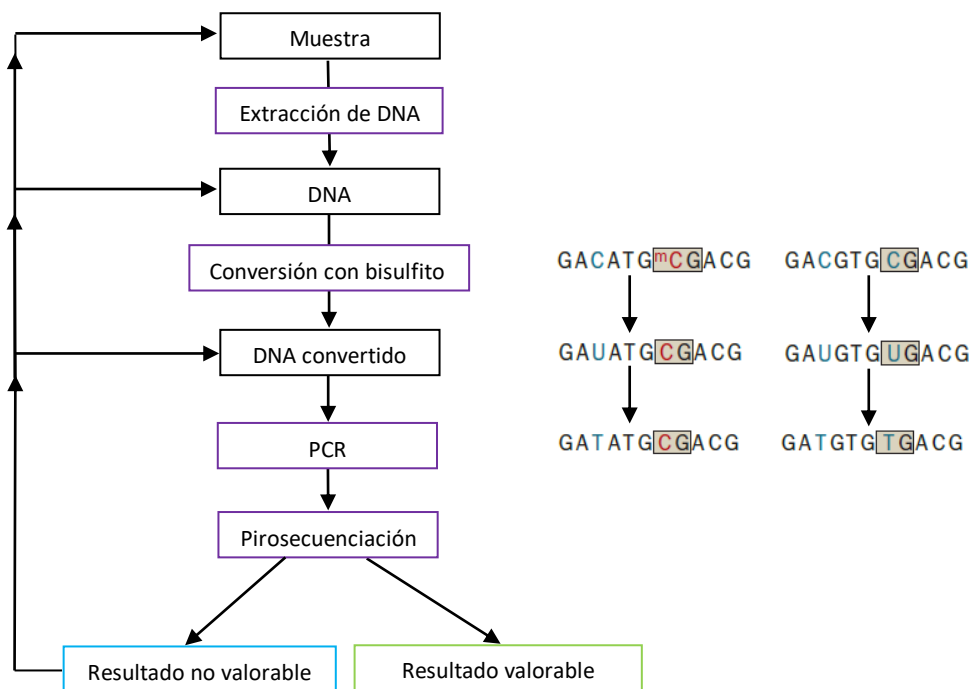


Figura 35. (Adaptada de (109)). Resumen de los pasos realizados con cada una de las muestras. En el caso en que el resultado no era valorable, se utilizaba el DNA convertido de nuevo. Si el caso seguía siendo no valorable, o en los casos en que no se disponía de DNA convertido, se utilizaba el DNA extraído. Si el caso aún era no valorable, o si no se tenía DNA extraído, se extraía nuevo DNA de la muestra.

4.2.1 Extracción del DNA

4.2.1.1 Extracción del DNA en tejido FFPE

El DNA se obtuvo a partir de cortes de tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE). El patólogo seleccionó las zonas tumorales, sobre cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Se procuró que dichas zonas incluyeran un mínimo de 80% de células tumorales y se excluyeran las áreas más necróticas y el tejido sano (Figura 36).

Entre 2 y 6 laminillas de 5 μm , en función del tamaño del área tumoral seleccionado, fueron desparafinadas con xilol/etanol y teñidas con hematoxilina-eosina. Se macrodisecaron las áreas de interés y se recogieron en el tampón de lisis, proporcionado por el kit "QIAamp® DNA micro kit" (Qiagen, Hilden, Germany). Posteriormente, se realizó la extracción del DNA, siguiendo las instrucciones del fabricante, con alguna modificación (Figura 36).

Cada muestra macrodisecada se digirió, durante 16-20 horas, a 56°C con proteinasa K. Tras digerirse el tejido, las muestras se incubaron a 90°C, 1 h, para revertir parcialmente los entrecruzamientos creados por el formol. Seguidamente, la muestra se procesó, en una columna de gel de sílica, obteniendo el eluido de DNA purificado.

La concentración de DNA extraído se cuantificó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm en el espectrofotómetro "DS-11" (DeNovix, Wilmington, Delaware, EEUU).

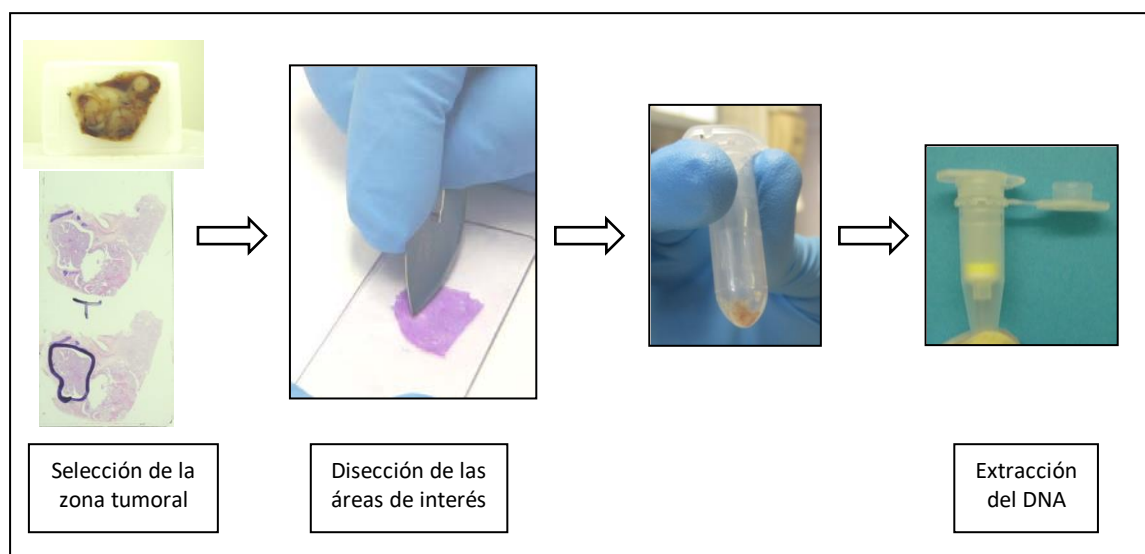


Figura 36. Pasos seguidos en el proceso de extracción del DNA de tejido.

4.2.1.2 Extracción del DNA en sangre

En lo que refiere a la muestra sanguínea, se extrajeron 10 ml de sangre venosa de cada paciente, en tubos “Vacutainer”, con gel de SST y activador de coagulación (Becton Dickinson, NJ, EE.UU.) y, para el plasma, los tubos contenían k2E (EDTA). El suero y el plasma se aislaron, después de centrifugar la muestra a 2500rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente, y fueron almacenados a -20°C hasta su análisis, después de una segunda centrifugación de iguales características. El DNA circulante, se obtuvo con el kit “QIAmp® Blood Mini-Kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. El proceso, fue análogo al realizado con el kit de tejido, pero en este caso sin precisar de una incubación prolongada con proteinasa K, ni a 90°C.

4.2.2 Conversión del DNA con bisulfito

El DNA extraído, se trató, químicamente, con bisulfito, para la modificación de las citosinas no metiladas a uracilos (Figura 37). Las citosinas metiladas (5-metilcitosinas) son resistentes a esta reacción y permanecen como citosinas. Este paso es necesario para convertir fragmentos de DNA iguales a nivel de bases, pero diferentes en metilación, en secuencias que sean distinguibles en una PCR.

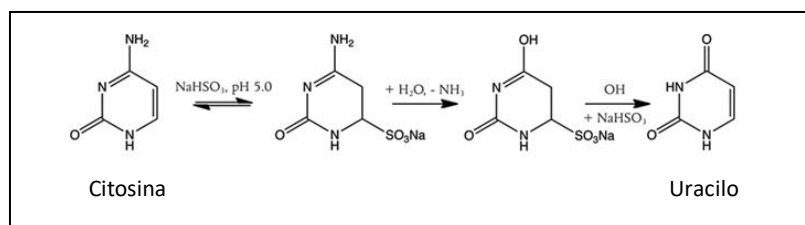


Figura 37. Reacciones químicas que intervienen en la conversión con bisulfito. Sulfonación, desaminación y desulfonación.

Esta conversión, se realizó con el kit “EZ-DNA Methylation-Gold kit®” (Zymo Research, Irvine, California, EEUU), siguiendo las instrucciones provistas. Brevemente, a 400 ng de DNA (en 10 µl) se le añadieron 130 µl de “CT conversion reagent”. Las muestras se incubaron a 98°C, durante 10 minutos, y a 64°C, 2,5horas. Posteriormente, se aplicaron a una columna “Zymo-Spin IC™” de gel de sílica, donde se unió el DNA. La reacción se completó añadiendo, a la columna, 200 µl de “M-desulphonation buffer” e incubándola durante 20 min con el DNA. Finalmente, tras dos lavados con los tampones del kit, se recuperó el DNA, ya modificado, en 20 µl de tampón de elución.

El DNA que se obtiene, mediante este proceso, es altamente inestable, ya que las cadenas han dejado de ser complementarias, y se ha de manipular siempre en hielo. En nuestro caso, el DNA fue conservado a -20°C hasta su utilización.

En lo que se refiere a las muestras controles utilizadas, el control positivo (DNA completamente metilado) utilizado en la PCR, “CpGenome™ Universal Methylated DNA Millipore”, fue modificado, en paralelo, con las muestras. El control positivo no metilado (DNA completamente no metilado) se compró ya modificado, “EpiTect® control DNA (human) unmethylated and bisulfite converted” (100), Qiagen.

4.2.3 Reacción de la cadena de polimerasa específica de metilación (MSP)

Inicialmente, en el estudio original, las muestras fueron analizadas mediante la PCR específica de metilación (MSP). A partir del DNA modificado, se realizó la MSP, es decir, se amplificaron separadamente, con cebadores específicos, las secuencias de *MGMT* metiladas y las no metiladas. En cada análisis, se incluyó la muestra por duplicado, dos controles comerciales (DNA metilado y DNA no metilado) y un control sin muestra, agua. Las parejas de cebadores utilizadas fueron las descritas por Esteller y colaboradores, y se indican en la tabla 15 (239). Las condiciones de termociclado fueron de 5 min a 95°C, seguido de 42 ciclos de (30”95°C, 30” 59°C, 30”72°C) y 5 min a 72°C. En las muestras de suero y plasma se utilizaron 50 ciclos. Las concentraciones finales de los reactivos de PCR fueron: “HotStart®Plus” (Qiagen, Izasa, España) 0,5 U/μl, MgCl₂ 2 mM, dNTP 200 μM y cebadores 0,2 μM. Los productos de las PCR se analizaron en un gel de agarosa de alta resolución, al 2,5%, teñido con “SYBR® Safe DNA gel stain” (Invitrogen, Thermofisher, España).

Región amplificada	Medida del fragmento	Secuencia de los cebadores	
Promotor no metilado	92pb	Forward	5'- TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT -3'
		Reverse	5'- AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A -3'
Promotor metilado	80pb	Forward	5'-GGG CTC TGG AGG AAA AGA AAG -3'
		Reverse	5'- CTC CAT CTC ATA GCT GTC GG -3'

Tabla 15. Secuencia de los cebadores empleados para el estudio de la metilación del promotor de *MGMT*.

Una muestra se consideró metilada al observarse una banda en la PCR con cebadores metilados. Cuando no se observaba ninguna banda en ningún tubo, la muestra se valoró como "no evaluable". En algunos casos, con resultados diferentes en el duplicado de la muestra, esta se volvió a analizar por triplicado. Se consideró como positiva, cuando se objetivó banda en 2 de los cinco ensayos.

4.2.4 Pirosecuenciación

El DNA purificado y convertido (20 ng), se utilizó para amplificar el promotor de *MGMT*, con los cebadores específicos del kit "Pyromark®Q24 CpG MGMT", diseñados para analizar las CpGs 74 - 75 - 76 - 77 y 78. El protocolo, las condiciones y los reactivos usados para la PCR fueron los dados por el kit "PyroMark®PCR". Los cebadores, se utilizaron a una concentración final de 0,2 µM. Las condiciones de termociclado, para las muestras de tejido, fueron de 5 min a 95°C, seguido por 45 ciclos de (20" 95°C, 30" 53°C, 20" 72°C) y 5 min a 72°C. Para las muestras de sangre, inicialmente se aplicaron las mismas condiciones, pero, *a posteriori*, dado que los resultados obtenidos no se encontraban dentro del rango óptimo requerido por la técnica, se aumentó la amplificación a 50 ciclos. Ya que varias muestras se procesaron en paralelo, para cada amplificación de PCR se incluyeron un control positivo de metilación, uno negativo y una muestra de agua.

La reacción de pirosecuenciación se realizó con el sistema "Qiagen PyroMark Q24 system" (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), según sus protocolos. Dicho sistema, aprovecha la biotinilización de uno de los cebadores, el que generara la cadena molde, para purificar dicha cadena y ponerla en contacto con el cebador de secuenciación.

Resumidamente, el producto de la PCR (10µl) fue incubado con "Streptavidina Sepharose perls" (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) durante 10min a 1400 rpm, para unir los productos de la PCR a las esferas de sefarosa.

Posteriormente, para purificar la cadena molde, se utilizó la "Pyromark Q24 Vaccum Workstation" (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), en la que, de manera secuencial, se fueron lavando las cadenas de DNA con etanol, tampón de desnaturalización y tampón de lavado, para finalmente obtener la cadena molde (Figura 38). Las cadenas molde de DNA purificadas, se hibridaron con el cebador de secuenciación en el "annealing buffer" (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), a una concentración de 0,4 µM, durante 2 min a 80°C y, tras ello, atemperados durante 20 min.

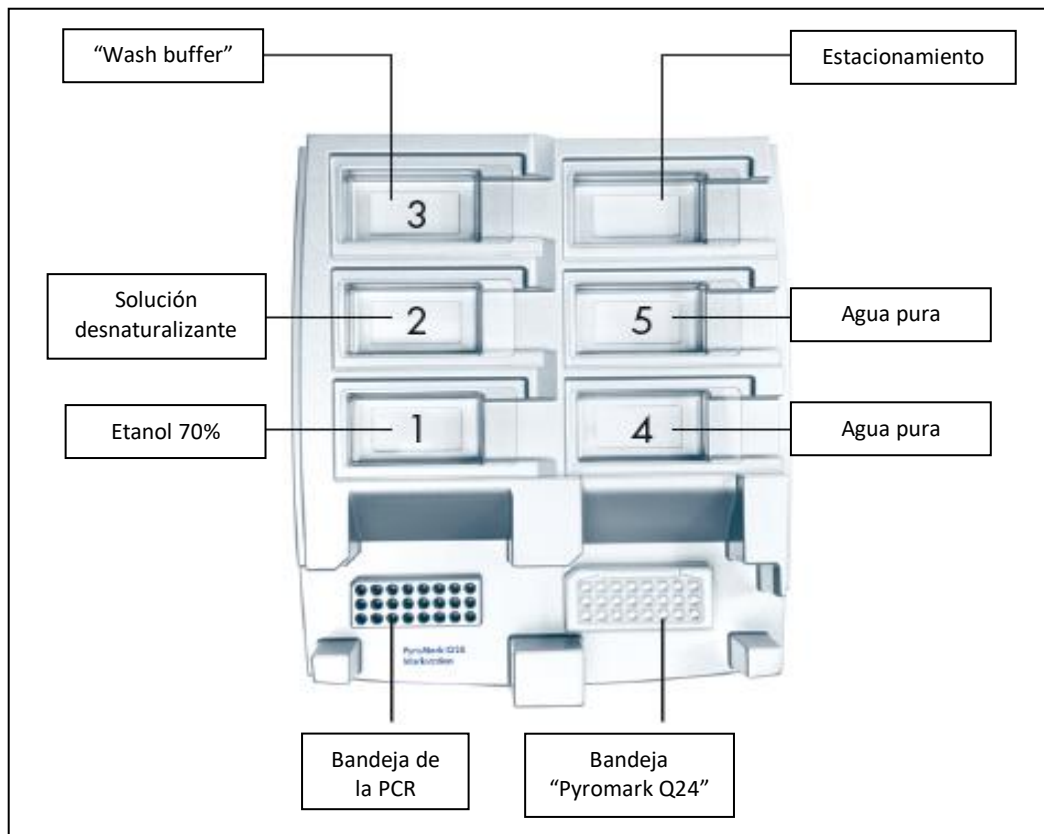


Figura 38. Esquema de la estación de trabajo ("Pyromark Q24 Vaccum workstation") con cada uno de los pasos.

Finalmente, las muestras se procesaron en el equipo "Qiagen Pyromark Q24 System", con los reactivos de "Pyromark Gold Q24 Reagents", que incluyen los dNTP, así como los enzimas necesarios para que la reacción de pirosecuenciación, propiamente dicha, tenga lugar. Con la selección del ensayo de MGMT, la secuencia a analizar fue "YGTTTTGYGTTTTGAYGTTYGTAGGTTTT", donde "Y" representa la base interrogada (C o T). El orden de dispensación de los dNTP fue el siguiente: "GTCGTTAGTCAGTTCGTATCAGTCGTC^A". Esta última C, marcada en amarillo, y visualizada en el histograma (Figura 39), es un control del tratamiento con bisulfito. El histograma esperable, con este ensayo, es el siguiente:

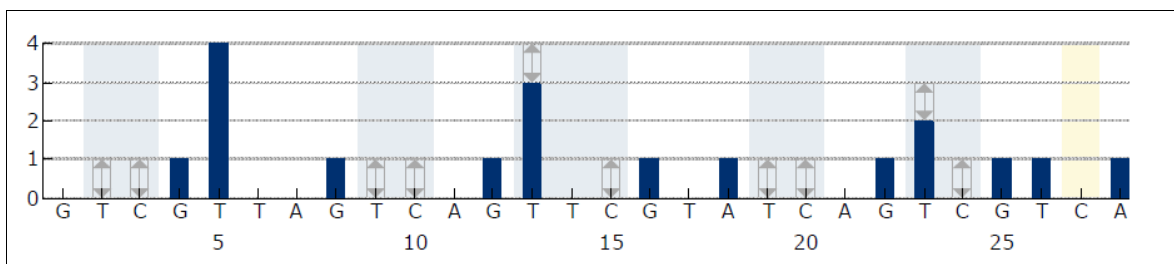


Figura 39. Histograma.

Tanto la programación de la pirosecuenciación y orden de dispensación, como el análisis posterior de los resultados, se realizó con el programa “Pyromark Q24 2.0.8”.

El DNA comercial no metilado (N=13), se utilizó para calcular la línea base o “punto de corte técnico” de la determinación del estado de la metilación de *MGMT*, mediante pirosecuenciación.

Los pirogramas que se consideraron valorables fueron únicamente aquellos en los que la RLU (relative light unit), en el eje Y, era superior a 25. En las figuras 40, 41 y 42 se muestran ejemplos de pirogramas obtenidos al analizar la metilación del promotor de *MGMT* en muestras de tejido. En las 40 y 41 se observan ejemplos de pirogramas en el que el valor en el eje Y no era 25 y, por tanto, se consideró “no óptimo” para la valoración del resultado. Mientras que en la figura 42 se muestra un resultado valorable.

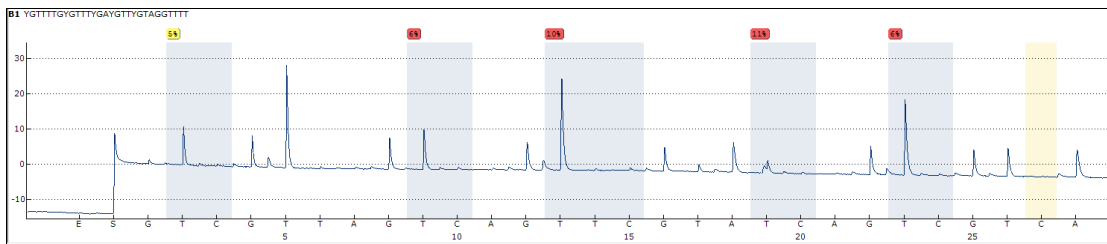


Figura 40. Pirograma no valorable.

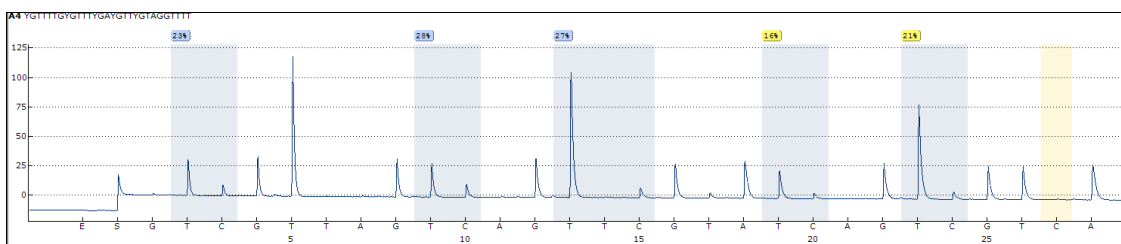


Figura 41. Pirograma no valorable.

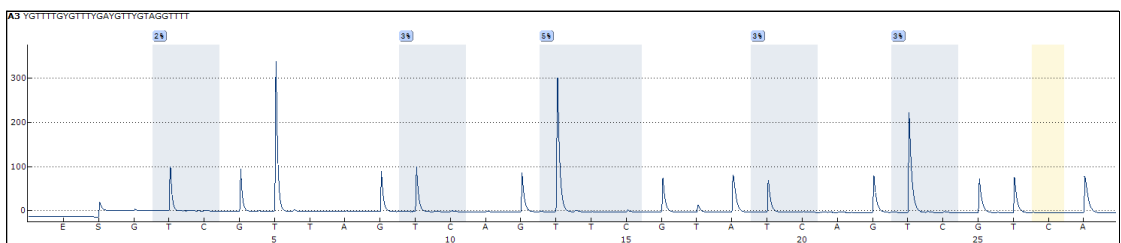


Figura 42. Pirograma valorable.

4.3 Análisis estadístico

Los datos se implementaron en una base de datos extraída de la utilizada en el ensayo GENOM 009, que contenía las variables relevantes. El procesamiento estadístico de las variables de estudio se realizó con el programa bioestadístico “SPSS” (versión 24.0) para Windows (IBM Corp., Armonk, NY).

El estudio descriptivo de la población se realizó mediante un estudio de frecuencias. Las variables categóricas se evaluaron mediante el test de Chi-cuadrado o test de Fisher, en caso necesario, en una tabla de contingencias de 2x2.

En lo que se refiere al análisis del impacto pronóstico y predictivo del estado de metilación de *MGMT* mediante ambas técnicas, la SLP y la SG se evaluaron usando el método de Kaplan-Meier y se compararon las curvas con el test de log-rank.

Con la finalidad de evitar factores de confusión, en el primer estudio, con MSP, los encargados de manipular las muestras de tejido y de sangre utilizaron diferente codificación para los casos. De este modo, no podían saber el resultado que se obtenía en un mismo caso, en distinta muestra.

Los resultados de la pirosecuenciación se entregaron, en forma de porcentaje, para cada una de las citosinas de las posiciones CpGs de la 74 a la 78, de cada muestra (suero, plasma y tejido). Así mismo, se creó una nueva variable utilizando la media del porcentaje de metilación de esas 5 posiciones para cada tipo de muestra y caso.

Para determinar el punto de corte, con relevancia clínica, para cada CpG y las medias, se utilizó el programa “RStudio v3.4.4”. Mediante las “Estadísticas de clasificación máxima seleccionada” (paquete maxstat de la versión 1.1.442) se determinó el punto de corte que predijo la diferencia máxima en SG, dándole el nombre de “mejor punto de corte”. Luego, se buscó el punto de corte mínimo en el que las diferencias en SG comenzaron a ser significativas ($p < 0,05$), llamándole “punto de corte mínimo”. Según estos últimos valores, se construyó una variable dicotómica con el término: muestra con promotor de *MGMT* metilado o muestra MET, si el valor era superior al punto de corte, o muestra con promotor de *MGMT* no metilado o no-MET, si el valor era inferior o igual al punto de corte. Esos valores fueron los utilizados para el resto de análisis estadísticos.

El paquete "epiR" de R se utilizó para calcular la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) de los distintos casos para predecir el resultado del estado de metilación. Se entiende como sensibilidad la probabilidad de que un individuo con evento tenga un resultado positivo en una prueba (verdaderos positivos), mientras que la especificidad define la probabilidad de que un individuo sin evento tenga un resultado negativo en la prueba. En cuanto al VPP, es la proporción de verdaderos positivos entre el global de positivos (verdaderos positivos/ verdaderos positivos + falsos positivos), y el VPN, la de verdaderos negativos entre todos los negativos. Dado que en este caso, ninguno de los resultados se puede considerar el de referencia, se realizaron comparaciones de manera bilateral entre resultado en tejido por ambas técnicas (MSP vs pirosecuenciación y pirosecuenciación vs MSP), ambas muestras por pirosecuenciación (plasma vs tejido por pirosecuenciación) y ambas muestras por MSP (sangre vs tejido por MSP).

Las variables categóricas se compararon con la prueba Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Todos los pacientes que comenzaron el tratamiento se incluyeron en los análisis. La respuesta al tratamiento neoadyuvante se evaluó, tras dos ciclos, según los criterios RANO. Para esta valoración, las respuestas se agruparon en beneficio clínico (enfermedad estable, respuesta parcial o respuesta completa) y no beneficio clínico (progresión). La SLP se definió como el tiempo desde la inclusión del paciente, en el ensayo clínico, hasta la primera progresión documentada o la muerte por cualquier causa. La SG se definió como el tiempo desde la inclusión hasta la muerte por cualquier causa. Los pacientes que todavía estaban libres de progresión o vivos en la fecha del último contacto fueron censurados. Las medianas de la SLP y la SG se calcularon con el método de Kaplan-Meier y se compararon mediante la prueba de log-rank. Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y la significación se estableció en 0,05.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Características de los pacientes

La mediana de edad de los pacientes, analizados en nuestra cohorte, fue de 63 años (36-79) y el 58,8% (N=60) eran hombres. En lo que se refiere al estado funcional, la mayoría (71,3%) tenían un PS de 0-1 y el 48% un índice de Barthel (ver anexo 2) mayor a 90. Neurológicamente, el 54,9% tenía un MMSE \geq 27 y el 59,8% presentaba algún déficit. Las localizaciones más frecuentes del GB fueron temporal, en un 30,4%, frontal en un 28,4% y parietal en un 23,5%.

En las siguientes tablas se presentan todas las características detalladas de los pacientes.

Característica	N=102 N (%)
Edad	
Mediana (rango)	63 (36-79)
\geq 50 años	97 (95,1)
<50 años	5 (4,9)
Sexo	
Hombre	60 (58,8)
Mujer	42 (41,2)
Localización tumoral	
Temporal	31 (30,4)
Frontal	29 (28,4)
Parietal	24 (23,5)
Cuerpo caloso	7 (6,86)
Occipital	3 (2,94)
Multicéntrico/multifocal	3 (2,94)
Tálamo	2 (1,96)
Hipotálamo	1 (0,98)
Desconocida	2 (1,96)

Característica	N=102 N (%)
Tratamiento dentro del ensayo	
No	9 (8,8)
Si	93 (91,2)
Rama de tratamiento	
A: TMZ	53 (52)
B: TMZ + Bev	49 (48)
Tipo de cirugía	
Biopsia	83 (81,4)
Resección parcial	17 (16,7)
Desconocida	2 (1,96)

Tabla 16 y 17. Características de los pacientes.
N: Número de pacientes.

Característica	N=102 N (%)
PS	
0-1	72 (71,3)
>2	29 (28,7)
MMSE test	
≥27	56 (54,9)
<27	37 (36,3)
Desconocido	9 (8,8)
Índice de Barthel	
>90	49 (48)
70-90	30 (29,4)
<70	17 (16,7)
Desconocido	6 (5,9)

Tabla 18. Estado funcional de los pacientes.

Característica	N=102 N (%)
Déficit neurológico	
No	40 (39,2)
Si	60 (58,8)
Desconocido	2 (2)
Tipo de déficit neurológico	
Ninguno/desconocido	41 (40,2)
Más de uno	18 (17,6)
Síntomas motores	20 (19,6)
Lenguaje	9 (8,8)
Cognitivo	5 (5)
Sensorial	4 (3,9)
Visual	3(2,9)
Convulsiones	2 (2)

Tabla 19. Estado neurológico de los pacientes.

Característica	N=102 N (%)
Uso de anticonvulsivantes	
No	52 (51)
Si	48 (47)
Desconocido	2 (2)
Fármacos anticonvulsivantes	
1 fármaco	42 (41,14)
2 fármacos	4 (3,92)
3 fármacos	1 (0,98)
Desconocido	55 (53,96)

Tabla 20. Tratamiento anticonvulsivante.

5.2 Muestras

El ensayo incluyó 102 pacientes, de los cuales, finalmente, se recopilaron 81 muestras de tejido y 83 de sangre. En éstas se realizó el análisis de la metilación del promotor de *MGMT* mediante MSP.

Dado que el presente proyecto se realizó, *a posteriori*, y no de manera paralela, se dispuso de 78 muestras de tejido y 64 de sangre (suero o plasma) para comparar el análisis por pirosecuenciación.

La determinación por MSP en tejido (M-MSP-T) fue informativa en 73 pacientes, mientras que con pirosecuenciación (M-PIR-T) lo fue en 74. Es decir, 8 muestras fueron no valorables por MSP y 4 por pirosecuenciación. En cuanto a las muestras de sangre, 74 pacientes tuvieron un resultado con MSP (M-MSP-S) mientras que, con pirosecuenciación, 53 lo tuvieron en el suero (M-PIR-Su) y 49 en el plasma (M-PIR-P), siendo 3 muestras no valorables en suero y 6 en plasma. No todos los pacientes tuvieron resultados para muestras pareadas, de hecho 70 tuvieron resultados en tumor utilizando las dos técnicas, 50 pacientes mediante MSP tanto en sangre como en tejido, 33 en tumor y plasma por pirosecuenciación y 39 en tumor y suero. En total, se obtuvieron resultados valorables en el 90,1% de muestras para M-MSP-T y 89,2% para M-MSP-S. Mientras que, con pirosecuenciación, 94,9% para M-PIR-T, 94,6% para M-PIR-Su y 89,1% para M-PIR-P.

Esta distribución total de los pacientes y las muestras con resultados valorables, se esquematiza en la siguiente figura.

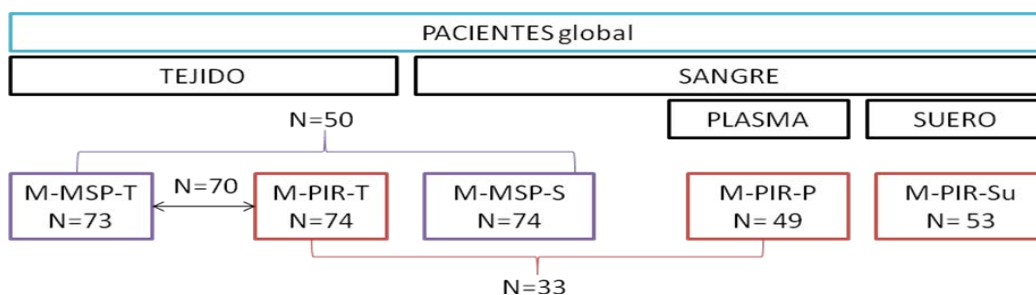


Figura 43. Muestras de los pacientes incluidos en nuestro proyecto.

La correlación entre el estado de metilación del promotor de *MGMT*, por ambos métodos, y el beneficio clínico, SLP y SG sólo se calculó para los pacientes tratados dentro del ensayo y con resultado informativo (Figura 44).

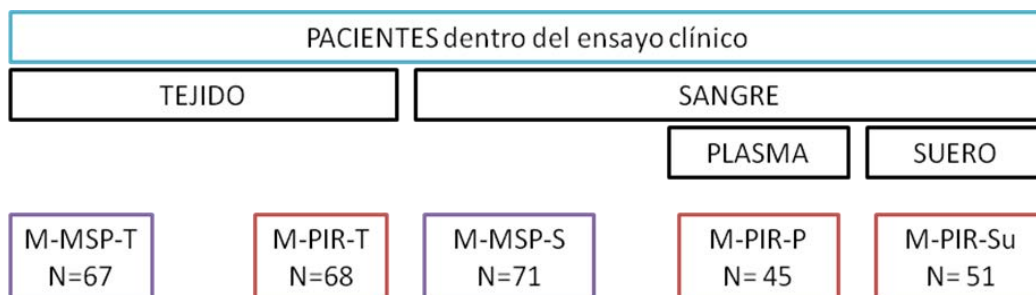


Figura 44. Muestras disponibles de los pacientes incluidos en el ensayo clínico GENOM 009.

5.2.1 Muestras de tejido

De los 102 pacientes totales, en 21 no se recopilaron las muestras histológicas, por lo que no se pudo analizar la metilación del promotor de *MGMT*. El resto, se fueron recolectando, conforme eran recibidas de otros centros, y se congelaron para el posterior análisis por MSP.

El proyecto de la pirosecuenciación se inició 3 años después. Durante este tiempo, las muestras permanecieron almacenadas en congelación. Algunas se preservaron en forma de DNA modificado mediante bisulfito, otras disponían de DNA extraído remanente y otras, incluso, de muestra histológica.

En nuestro estudio actual, con la finalidad de sacar el máximo rendimiento del material restante, inicialmente, se analizaron las muestras almacenadas de DNA modificado con bisulfito. En los casos en que el resultado era no valorable, o en rangos no óptimos para la exigencia de la técnica, se repitió la amplificación por PCR o la extracción del DNA. De este modo, sólo se tuvieron en cuenta los resultados que estaban dentro de los rangos óptimos de la técnica. Algunos casos no valorables, fueron descartados por no disponer de más material genético o muestra de parafina.

5.2.2 Muestras de sangre

De nuestra cohorte de 102 casos, en 38 no se tuvieron muestras de sangre (ni plasma ni suero). Por lo que se recopilaron 64 muestras sanguíneas, 55 de plasma y 56 de suero.

5.3 Determinación del punto de corte de la pirosecuenciación

5.3.1 Punto de corte técnico

Uno de los procesos que se realizó, antes de analizar los resultados de las muestras, fue el estudio de la metilación del promotor de *MGMT*, mediante pirosecuenciación, en el DNA no metilado comercial. Un total de 13 controles no metilados se valoraron con pirosecuenciación, obteniendo un media de metilación de 2,88 (desviación estándar de +/- 0,71). Este valor fue el que se consideró, a partir de ese momento, como el “punto de corte técnico”. Los porcentajes de metilación inferiores a este valor, fueron determinados como negativos.

5.3.2 Metilación en muestras no patológicas

Con la finalidad de tener una referencia del grado de metilación de *MGMT* normal, se analizó, mediante pirosecuenciación, tejido no tumoral, a modo de muestras control. Así pues, se analizaron 11 muestras de linfocitos sanguíneos, 10 de colon y 6 de cerebro normal. De entre las muestras de cerebro, en 5 se valoró, por separado, la sustancia blanca (s.blanca) y la gris (s.gris). Se analizaron las 5 CpGs de cada muestra y se calculó, por un lado, la media de las 5 CpGs de cada caso y, por otro, la media de todos los casos para cada posición (Tabla 21).

La media de metilación para los linfocitos fue de 2,8 (desviación estándar +/- 1,11); para las muestras de colon, 2,4 (+/- 2,06); para el cerebro normal, 3,7 (+/- 1,03); para la s.gris 3,2 (+/- 0,8) y para la s.blanca 8,5 (+/- 4,96) (Tabla 21).

	Media CpG 74	Media CpG 75	Media CpG 76	Media CpG 77	Media CpG 78	Media	Desviación estándar
Linfocitos	2,1	2,9	2,9	1,8	4,2	2,8	1,11
Colon	1,7	2,8	3,1	1,7	2,9	2,4	2,06
Cerebro	3,5	3,7	4,5	2,7	4,4	3,7	1,03
S.Blanca	3,8	6,6	8	7,8	16,4	8,5	4,96
S.Gris	2	3,6	2,2	5,8	2,4	3,2	0,80

Tabla 21. Resultados de la metilación de *MGMT* en las muestras no patológicas, con la media y la desviación estándar para cada muestra.

5.3.3 Puntos de corte para las muestras de sangre y tejido

Se obtuvieron los resultados del porcentaje de metilación de cada una de las 5 citosinas (74-78) de las CpG del promotor de *MGMT* analizadas en tejido, suero y plasma. Se realizó la media de estas cinco posiciones y se analizó el punto de corte en el que se identificaban las diferencias máximas en SG. A este punto se le llamó “mejor punto de corte”.

El “mejor punto de corte” para el promedio de las cinco posiciones CpG fue: 11,4% en el tumor (M-PIR-T), 3,4% en el plasma (M-PIR-P) y 1,6% en el suero (M-PIR-Su).

Dado que no se pudo identificar una correlación significativa entre el “mejor punto de corte” para el suero y la SG, y que los valores de metilación de éste eran inferiores a las muestras control de DNA no metilado comercial (“punto de corte técnico”), los valores del suero se descartaron para análisis adicionales.

Más allá del “mejor punto de corte”, se analizó el valor mínimo a partir del cual se objetivaban diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), en SG, el cual se llamó “punto de corte mínimo”. Este punto, basado en la media de las 5 CpGs analizadas, fue de 5% ($p = 0,009$) para M-PIR-T y 3,4% ($p = 0,01$) para M-PIR-P y fue el valor que se utilizó para determinar una muestra como MET o no-MET (Tabla 22).

	M-PIR-T	M-PIR-P
Punto de corte mínimo	5%	3,4%
Valor p	0,009	0,01

Tabla 22. Punto de corte mínimo para M-PIR-T y M-PIR-P.

Las tabla 23, 24 y 25 presentan los porcentajes de metilación de cada una de las CpGs (74-78) en las muestras de tejido, plasma y suero analizadas mediante pirosecuenciación. Del mismo modo, se refleja su media, mediana, desviación estándar, “mejor punto de corte” y significación estadística (valor p para diferencias en supervivencia global). El “mejor punto de corte” representa el punto en el que se observaban las máximas diferencias en SG.

	M-PIR-T (% de metilación de las CpG)					
	CpG 74	CpG 75	CpG 76	CpG 77	CpG 78	Media
Media	18,86	19,82	18,88	19,69	13,95	18,24
Mediana	4	6,5	7	4,5	5,5	5,8
Desviación estándar	24,71	23,70	23,05	25,83	20,52	21,61
Mejor punto de corte	6	6	10	15	8	11,4
Valor p para diferencias en SG	(0,001)	(0,003)	(0,001)	(0,002)	(0,008)	(0,002)

Tabla 23. Resultados en tejido. Se muestra el “mejor punto de corte” para cada CpG. En verde, el “mejor punto de corte” para la media. Entre paréntesis, se muestra el valor p para la significación en SG.

	M-PIR-P (% de metilación de las CpG)					
	CpG 74	CpG 75	CpG 76	CpG 77	CpG 78	Media
Media	7,27	8,49	9,33	8,10	8,86	8,40
Mediana	2	3	3	2	3	2,8
Desviación estándar	18,01	18,72	19,15	19,86	20,04	19,96
Mejor punto de corte	3	4	8	3	6	3,4
Valor p para diferencias en SG	(0,023)	(0,177)	(0,002)	(0,01)	(0,057)	(0,005)

Tabla 24. Resultados en plasma. Se muestra el “mejor punto de corte” para cada CpG. En verde, el “mejor punto de corte” para la media. Entre paréntesis, se muestra el valor p para la significación en SG.

	M-PIR-Su (% de metilación de las CpG)					
	CpG 74	CpG 75	CpG 76	CpG 77	CpG 78	Media
Media	6,19	7,23	7,19	6,57	7,60	6,9
Mediana	2	3	3	2	3	2,6
Desviación estándar	12,97	12,7	13,17	14,46	13,69	13,3
Mejor punto de corte	1	2	2	1	1	1,6
Valor p para diferencias en SG	(0,069)	(0,223)	(0,05)	(0,023)	(0,099)	(0,058)

Tabla 25. Resultados en suero. Se muestra el “mejor punto de corte” para cada CpG. En verde, el “mejor punto de corte” para la media. Entre paréntesis, se muestra el valor p para la significación en SG.

5.4 Análisis individual de las diferentes CpGs

Como se ha explicado previamente, para llevar a cabo los análisis estadísticos de las muestras de pirosecuenciación, se optó por usar la media del porcentaje de metilación de las 5 CpGs analizadas. No obstante, una vez obtenidos los dos puntos de corte (el “mejor” y el “mínimo”), se determinó cuantos pacientes definidos como MET, por el valor de la media de las 5CpGs, hubieran tenido un resultado diferente al analizar cada una de las CpGs por separado y, al contrario, cuantos no-MET, hubieran resultado MET. Así pues, se entrecruzaron los puntos de corte de cada posición de CpG con los de tejido y plasma.

En la tabla 26, se presentan los resultados para el “mejor punto de corte” en tejido para cada CpG cruzado con el “mejor punto de corte” de la media. En verde se marcan los casos coincidentes y en azul los casos MET según el “mejor punto de corte” de cada citosina individual, pero no-MET según la media.

				Mejor punto de corte de la media de CpGs		Total
				≤11,4%	>11,4%	
CpG 74 Mejor punto de corte 6%	No MET	N	39	1	40	
		%	52,7%	1,4%	54,1%	
	MET	N	5	29	34	
		%	6,8%	39,2%	45,9%	
Total		N	44	30	74	
		%	59,5%	40,5%	100%	
CpG 75 Mejor punto de corte 6%	No MET	N	37	0	37	
		%	50%	0%	50%	
	MET	N	7	30	37	
		%	9,5%	40,5%	50%	
Total		N	44	30	74	
		%	59,5%	40,5%	100%	
CpG 76 Mejor punto de corte 10%	No MET	N	42	5	47	
		%	56,8%	6,8%	63,5%	
	MET	N	2	25	27	
		%	2,7%	33,8%	36,5%	
Total		N	44	30	74	
		%	59,5%	40,5%	100%	

Tabla 26. Resultados del “mejor punto de corte” en tejido, según la media, y según la posición de cada CpG individual. N: número de pacientes, %: porcentaje del total.

				Mejor punto de corte de la media de CpGs		Total
				≤11,4%	>11,4%	
CpG 77 Mejor punto de corte 15%	No MET	N	44	4	48	
		%	59,5%	5,4%	64,9%	
	MET	N	0	26	26	
		%	0%	35,1%	35,1%	
Total		N	44	30	74	
		%	59,5%	40,5%	100%	
CpG 78 Mejor punto de corte 8%	No MET	N	40	6	46	
		%	54,1%	8,1%	62,2%	
	MET	N	4	24	28	
		%	5,4%	32,4%	37,8%	
Total		N	44	30	74	
		%	59,5%	40,5%	100%	

Tabla 26 (continuación). Resultados del “mejor punto de corte” en tejido, según la media, y según la posición de cada CpG individual. N: número de pacientes, %: porcentaje del total.

Por lo tanto, de manera resumida, el número de casos no-MET por la media pero MET por la valoración individual fueron: 5 en la CpG 74, 7 en la CpG 75, 2 en la CpG 76 y 4 en la CpG 78. En la CpG 77, con el “mejor punto de corte” individual en 15%, no hubo ningún caso determinado MET que fuera no-MET por la media.

En la tabla 27 se muestran los resultados obtenidos al comparar el “punto de corte mínimo” de la media, en tejido, frente a los valores del “mejor punto de corte” individuales de cada una de las CpGs.

				Punto de corte mínimo de la media de CpGs		Total
				≤5	>5	
CpG 74 Mejor punto de corte 6%	No MET	N	35	5	40	
		%	47,3%	6,8%	54,1%	
	MET	N	0	34	34	
		%	0%	45,9%	45,9%	
Total		N	35	39	74	
		%	47,3%	52,7%	100%	

Tabla 27. Resultados del “punto de corte mínimo” en tejido, según la media, y según el “mejor punto de corte” de la posición de cada CpG individual. N: número de pacientes, %: porcentaje del total.

		Punto de corte mínimo de la media de CpGs		Total	
		≤5	>5		
CpG 75 Mejor punto de corte 6%	No MET	N	34	3	37
		%	45,9%	4,1%	50%
	MET	N	1	36	37
		%	1,4%	48,6%	50%
Total		N	35	39	74
		%	47,3%	52,7%	100%
CpG 76 Mejor punto de corte 10%	No MET	N	35	12	47
		%	47,3%	16,2%	63,5%
	MET	N	0	27	27
		%	0%	36,5%	36,5%
Total		N	35	39	74
		%	47,3%	52,7%	100%
CpG 77 Mejor punto de corte 15%	No MET	N	35	13	48
		%	47,3%	17,6%	64,9%
	MET	N	0	26	26
		%	0%	35,1%	35,1%
Total		N	35	39	74
		%	47,3%	52,7%	100%
CpG 78 Mejor punto de corte 8%	No MET	N	34	12	46
		%	45,9%	16,2%	62,2%
	MET	N	1	27	28
		%	1,4%	36,5%	37,8%
Total		N	35	39	74
		%	47,3%	52,7%	100%

Tabla 27 (continuación). Resultados del “punto de corte mínimo” en tejido, según la media, y según el “mejor punto de corte” de la posición de cada CpG individual. N: número de pacientes, %: porcentaje del total.

En este análisis, únicamente 2 casos serían determinado como MET por la CpG individual (uno en la CpG 75 y otro en la 78), siendo no-MET por el valor “mínimo” de la media.

Para los valores de plasma, también se enfrentó el “mejor punto de corte” de cada una de las CpGs por separado, con el de la media. Estos datos se exponen en la tabla 28.

			Mejor punto de corte de la media de CpGs		Total
			≤3,4	>3,4	
CpG 74 Mejor punto de corte 3%	No MET	N	35	5	40
		%	71,4%	10,2%	81,6%
	MET	N	0	9	9
		%	0%	18,4%	18,4%
Total		N	35	14	49
		%	71,4%	28,6%	100%
CpG 75 Mejor punto de corte 4%	No MET	N	32	7	39
		%	65,3%	14,3%	79,6%
	MET	N	3	7	10
		%	6,1%	14,3%	20,4%
Total		N	35	14	49
		%	71,4%	28,6%	100%
CpG 76 Mejor punto de corte 8%	No MET	N	35	6	41
		%	71,4%	12,2%	83,7%
	MET	N	0	8	8
		%	0%	16,3%	16,3%
Total		N	35	14	49
		%	71,4%	28,6%	100%
CpG 77 Mejor punto de corte 3%	No MET	N	34	3	37
		%	69,4%	6,1%	75,5%
	MET	N	1	11	12
		%	2%	22,4%	24,5%
Total		N	35	14	49
		%	71,4%	28,6%	100%
CpG 78 Mejor punto de corte 6%	No MET	N	35	6	41
		%	71,4%	12,2%	83,7%
	MET	N	0	8	8
		%	0%	16,3%	16,3%
Total		N	35	14	49
		%	71,4%	28,6%	100%

Tabla 28. Resultados del “mejor punto de corte” en plasma, según la media, y según la posición de cada CpG individual. N: número de pacientes, %: porcentaje del total.

En conclusión, como se observa en la tabla 28, sólo 3 resultados tuvieron un resultado MET para la CpG 75 y uno para la CpG 77, siendo negativos por el valor de la media.

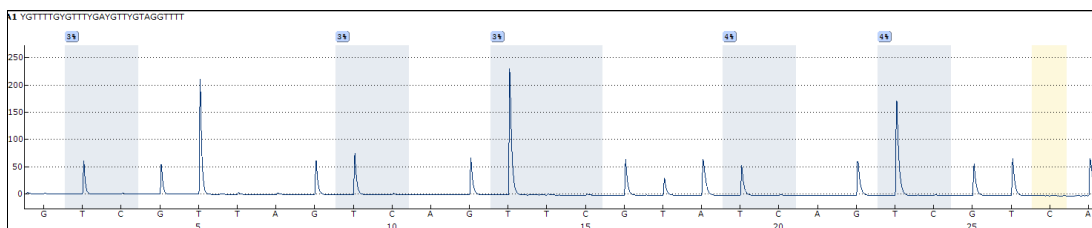


Figura 46. Muestra con resultado negativo para metilación. El porcentaje indica la proporción entre los valores de T y C para una CpG.

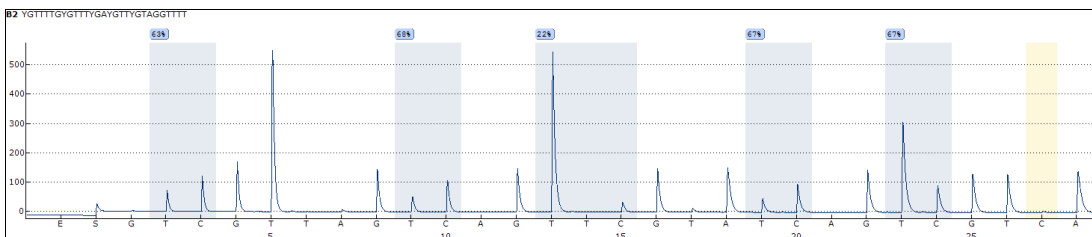


Figura 47. Muestra con resultado positivo para metilación.

En 14 de estos 74 casos estudiados por pirosecuenciación, la diferencia entre el porcentaje mayor y el menor entre las CpGs de una misma muestra, fue $\geq 25\%$. Siendo, la máxima diferencia entre CpGs, del 88% (de 11 a 98%).

Entre los 70 pacientes con resultados informativos en tejido, tanto para MSP como para pirosecuenciación, ocho (11,4%) identificados como no-MET por MSP fueron determinados como MET por pirosecuenciación. Por otro lado, tres (4,3%) reconocidos como MET por MSP fueron definidos como no-MET por pirosecuenciación. La concordancia entre M-MSP-T y M-PIR-T fue del 84,3% ($p < 0,001$) (Tabla 29).

Técnica y muestra	Técnica y muestra	M-MSP-T		Concordancia	χ^2 p
		Estado de metilación	MET N=34		
M-PIR-T	MET N=39	31 (44,3%)	8 (11,4%)	84,3	<0.001
	No-MET N=31	3 (4,3%)	28 (40,0%)		

Tabla 29. Concordancia entre M-MSP-T y M-PIR-T. N: Número de pacientes.

Con los datos obtenidos, también se analizó la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) de las dos técnicas, para la determinación de la metilación en tejido. En nuestro análisis, la pirosecuenciación tuvo una especificidad y VPP mayor en comparación con la MSP: sensibilidad de 90% frente a 72% y VPP de 91% frente a 78%.

Por el contrario, la MSP tuvo una sensibilidad y un VPN mejor: 91% frente a 78% y 90% frente a 75%, respectivamente (Tablas 30 y 31).

M-MSP-T vs M-PIR-T	
Sensibilidad	91% (76 - 98%)
Especificidad	75% (58 - 88%)
VPP	78% (62 - 89%)
VPN	90% (73 - 98%)

M-PIR-T vs M-MSP-T	
Sensibilidad	78% (62 - 89%)
Especificidad	90% (73 - 98%)
VPP	91% (76 - 98%)
VPN	75% (58 - 88%)

Tabla 30 y 31. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de M-MSP-T frente a M-PIR-T y a la inversa. N=70, χ^2 p<0,001.

5.5.2 Metilación del promotor de *MGMT* en sangre

El análisis de la metilación de *MGMT* en sangre, se realizó en 74 pacientes, por MSP. De estos, 11 pacientes (14,9%) fueron MET y 63 (85,1%) no-MET. Con la técnica de pirosecuenciación, se llevaron a cabo 55 determinaciones en plasma, obteniendo datos valorables en 49 de ellas, siendo 14 (28,6%) MET y 35 (71,4%) no-MET. Como se ha explicado previamente, aunque se analizaron 56 muestras de suero mediante pirosecuenciación, de las que 53 fueron valorables, estos datos no se utilizaron, puesto que el porcentaje de metilación en suero, estaba por debajo del “punto de corte técnico”.

Las muestras de sangre (plasma y suero), analizadas por pirosecuenciación, tuvieron unos valores homogéneos entre las 5 posiciones CpGs.

5.6 Correlación entre los resultados en sangre y tejido

5.6.1 Metilación del promotor de *MGMT* por MSP

En 50 casos se obtuvieron resultados valorables con MSP, pareados tejido y sangre (M-MSP-T y M-MSP-S). Al analizar la concordancia entre ambas muestras, se observó una discordancia en 19 pacientes (38%) (p=0,02) (Tabla 32).

Técnica y muestra	Técnica y muestra	M-MSP-T		Concordancia	χ^2 p
	Estado de metilación	MET N=26	No-MET N=24		
M-MSP-S	MET N=9	8 (16%)	1 (2%)	62	0,02
	No-MET N=41	18 (36%)	23 (46%)		

Tabla 32. Concordancia entre M-MSP-T y M-MSP-S. N: Número de pacientes.

Del mismo modo, se evaluó la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la sangre, mediante MSP, en comparación con el tejido. La sensibilidad fue del 31%, mientras que la especificidad fue del 96%. Los VPP y VPN fueron 89 y 56%, respectivamente (Tabla 33).

M-MSP-S vs M-MSP-T	
Sensibilidad	31% (14 - 52%)
Especificidad	96% (79 - 100%)
VPP	89% (52 - 100%)
VPN	56% (40 - 72%)

Tabla 33. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de M-MSP-S frente a M-MSP-T. N=50, χ^2 p=0,024.

5.6.2 Metilación del promotor de *MGMT* por pirosecuenciación

En 33 pacientes se tuvieron resultados pareados en tejido y plasma, mediante pirosecuenciación (M-PIR-T y M-PIR-P). La concordancia entre los valores fue de 63,7% ($p=0,23$) (Tabla 34).

Técnica y muestra	Técnica y muestra	M-PIR-T		Concordancia	χ^2 p
	Estado de metilación	MET N=7	No-MET N=26		
M-PIR-P	MET N=15	5 (15,2%)	10 (30,3%)	63,7	0,23
	No-MET N=18	2 (6,1%)	16 (48,5%)		

Tabla

Concordancia entre M-PIR-T y M-PIR-P. N= Número de pacientes.

34.

La sensibilidad del plasma frente al tejido fue del 38%, discretamente mayor que mediante MSP (31%), aunque con ambas técnicas fue baja. La especificidad fue del 76%, un valor bastante inferior al obtenido con la otra técnica (96%). El VPP fue del 60% y el VPN del 57% (Tabla 35).

M-PIR-P vs M-PIR-T	
Sensibilidad	38% (15 - 65%)
Especificidad	76% (50 - 93%)
VPP	60% (26 - 88%)
VPN	57% (34 - 77%)

Tabla 35. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de M-PIR-P frente a M-PIR-T. N=33, χ^2 p=0,465.

5.7 Impacto pronóstico y predictivo de la metilación del promotor de *MGMT*

Los datos de eficacia, es decir, supervivencia global (SG), supervivencia libre de progresión (SLP) y respuesta, solo se analizaron para los pacientes aleatorizados en el ensayo clínico GENOM 009.

La metilación del promotor de *MGMT*, mediante MSP, en tejido (M-MSP-T), se correlacionó con el beneficio clínico (enfermedad estable + respuesta parcial + respuesta completa) ($p=0,09$) (Figura 48). La SG fue de 4,9 meses en no-MET frente a 12,1 en MET ($p=0,001$) y la SLP fue de 2,2 meses en no-MET, mientras que en MET fue de 6,2 ($p=0,001$) (Figura 49 y 50).

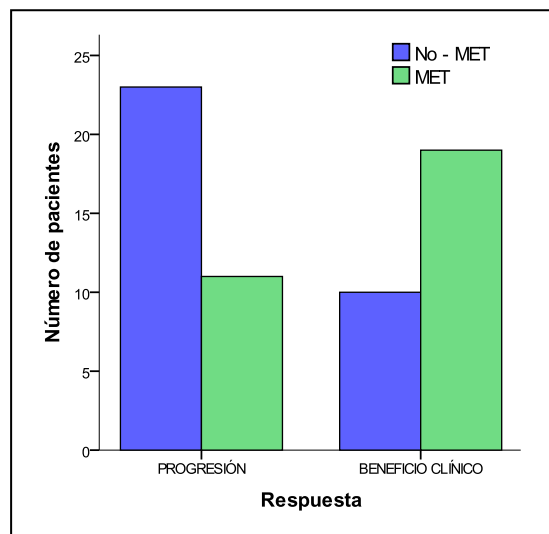


Figura 48. Beneficio clínico, evaluado según criterios RANO, para M-MSP-T. χ^2 $p=0,09$.

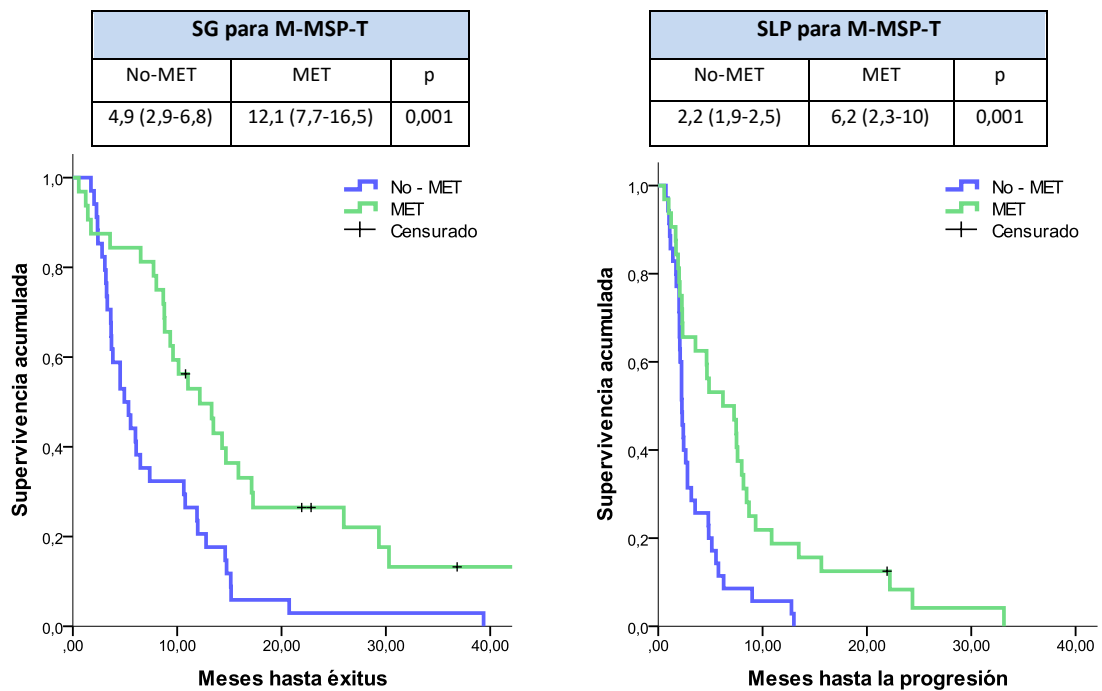


Figura 49 y 50. SG y SLP según M-MSP-T. En verde, casos MET y en azul, no-MET.

Por otro lado, la determinación en tejido, por pirosecuenciación (M-PIR-T) también se correlacionó con los resultados de beneficio clínico, SLP y SG ($p=0,004$, $p=0,001$, $p=0,005$, respectivamente) (Figura 51, 52 y 53).

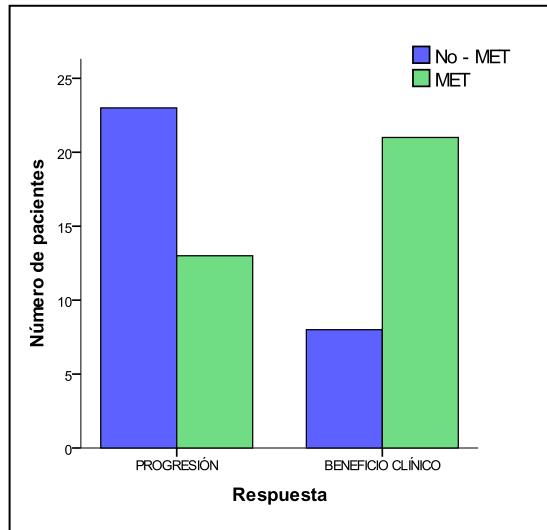


Figura 51. Beneficio clínico, evaluado según criterios RANO, para M-PIR-T. $\chi^2 p=0,004$.

SG para M-PIR-T		
No-MET	MET	p
4,9 (2,3-7,4)	9,6 (7,0-12,1)	0,005

SLP para M-PIR-T		
No-MET	MET	p
2,2 (1,9-2,5)	4,8 (1,8-7,9)	0,001

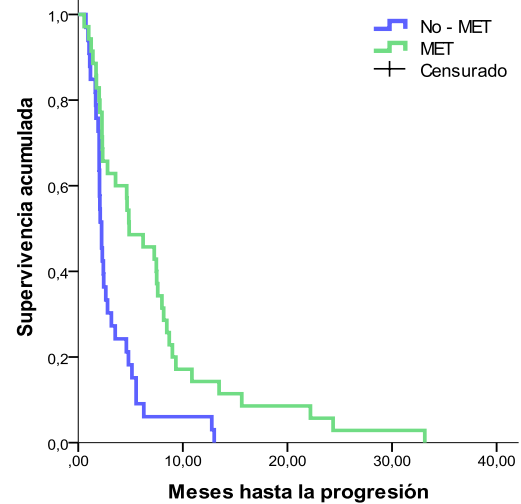
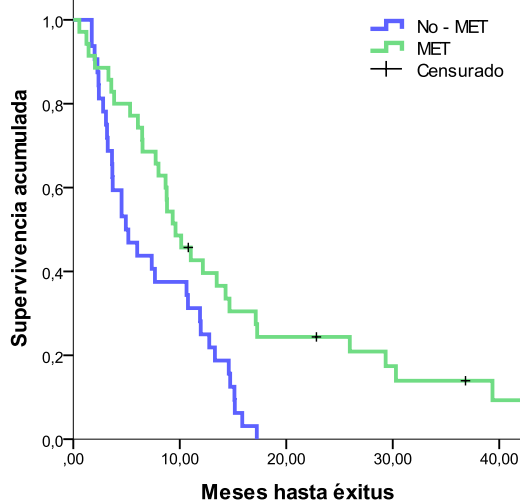


Figura 52 y 53. SG y SLP para M-PIR-T. En verde, casos MET y en azul, no-MET.

Los resultados de sangre, mediante MSP (M-MSP-S) no se asociaron con la SG ni con la SLP (Figura 54 y 55).

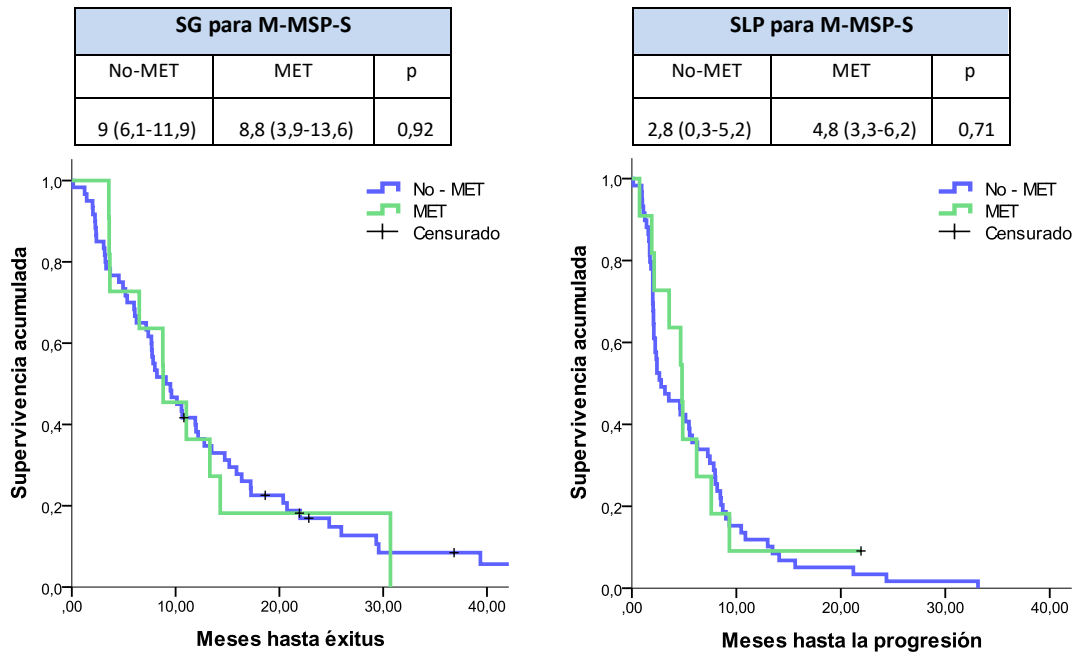


Figura 54 y 55. SG y SLP para M-MSP-S.

Sin embargo, al analizar el estado de la metilación del promotor de *MGMT* en plasma, por pirosecuenciación (M-PIR-P), los datos sí se correlacionaron con una mejor SG ($p=0,007$) y SLP ($p=0,002$) (Figura 56 y 57).

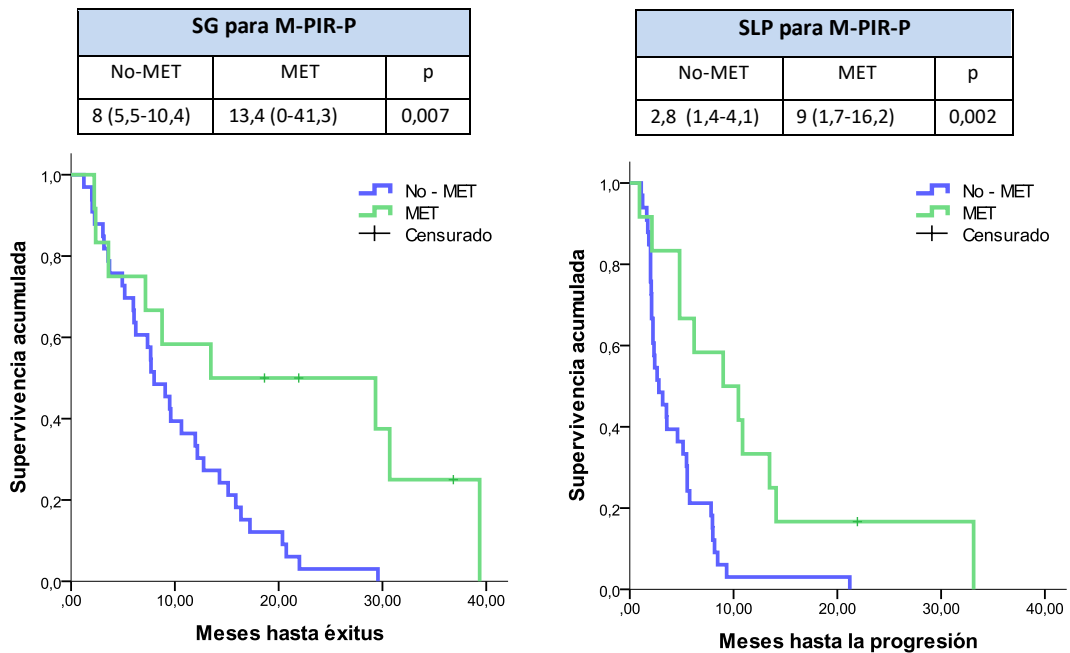


Figura 56 y 57. SG y SLP para M-PIR-P.

Los resultados de metilación de *MGMT* para M-MSP-S y M-PIR-P no se correlacionaron con el beneficio clínico ($p=0,127$ y $p=0,255$, respectivamente) (Figura 58).

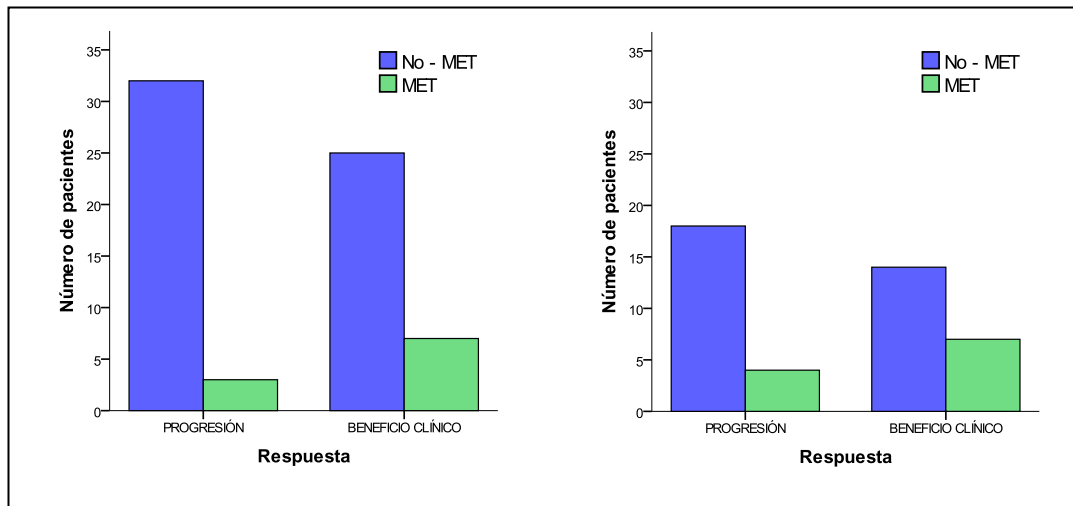


Figura 58. Beneficio clínico, evaluado según criterios RANO, para M-MSP-S (izquierda) y M-PIR-P (derecha).

Ya que M-PIR-P parecía ser un marcador más preciso que M-MSP-S, se intentó determinar si completando el resultado de MSP, con un segundo análisis por pirosecuenciación, mejoraría el valor pronóstico. Para ello, se comparó la SG en los pacientes definidos como MET por alguno de los dos métodos, con los identificados como no-MET por ambas pruebas. La SG fue de 9,6 meses (IC 95%; 6,2-12,9) para los pacientes MET y 4,5 meses (IC 95%; 2,5-6,5) para los pacientes no-MET ($p=0,004$), datos similares a los de M-MSP-S sola (9,1 vs 8,8 meses; $p=0,92$) (Tabla 36).

SuperMET*	63	SG	4,5 meses (2,5-6,5)	9,6 (6,2-12,9)	$p=0,004$
	64	SLP	2,3 meses (1,8-2,6)	4,6 (2,7-6,6)	$p=0,011$

Tabla 36. SLP y SG para el grupo "SuperMET". *Se entiende como "SuperMET" los pacientes que tuvieron un resultado positivo para metilación con ambas pruebas.

DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

El estudio de alteraciones moleculares, relacionadas con diferentes tipos de cáncer, es una herramienta cada vez más necesaria para determinar el diagnóstico, el pronóstico y la probabilidad de respuesta a un tratamiento. La obtención de muestra de tejido tumoral, mediante biopsia, no está exento de riesgos, y en el caso de los tumores cerebrales, comporta una complejidad añadida. Como alternativa a este procedimiento, se están llevando a cabo múltiples investigaciones para la búsqueda de biomarcadores en biofluidos, es decir, el uso de la “biopsia líquida”. El estudio en biopsia líquida, conlleva la necesidad del uso de técnicas cada vez más sensibles, para la detección de dichas alteraciones. Uno de los modos de evaluar la exactitud del resultado obtenido, con las diferentes metodologías, en líquidos biológicos, es comprobar su correlación en tejido. Aunque en nuestro análisis, al igual que en el resto de los publicados, hemos tomado la biopsia de tejido como la referencia para validar el resultado en biopsia líquida, este concepto es cuestionable. Por un lado, la biopsia de tejido puede no ser un reflejo del global del tumor. Por otro, se pueden detectar CTCs o ctDNA en líquidos biológicos de pacientes sin lesiones metastásicas, por lo que podría ser, incluso, más sensible que la propia biopsia para detectar micrometástasis ocultas (240).

En nuestro estudio, inicialmente, se determinó el estado de metilación del promotor de *MGMT*, en tejido y sangre, mediante la técnica de MSP y se compararon los resultados de manera pareada, encontrando una baja correlación entre ellos. Al analizar la supervivencia libre de progresión y supervivencia global, según el estado de metilación de ambas muestras (sangre y tejido), únicamente los pacientes con metilación del promotor de *MGMT*, en tejido, mostraron una mejor SLP y SG, en comparación con los que no la presentaban. Estos son datos ya publicados previamente (80). La baja concordancia entre los resultados nos hizo plantear que, quizá, otra técnica podría ser más sensible para la detección de metilación del promotor de *MGMT* en sangre y, por tanto, obtener una mayor concordancia con el tejido. Este hecho permitiría plantear el uso de la sangre como biopsia líquida en tumores del SNC. Del mismo modo, se cuestionó si esta nueva técnica también podría ser capaz de detectar más pacientes con metilación de *MGMT*, en las muestras de tejido.

6.1 Población a estudio

Las características demográficas de nuestros pacientes, concuerdan con la población típica afecta de GB. La edad media al diagnóstico fue de 63 años (siendo de 64 en la literatura) y la mayoría de pacientes eran hombres. En nuestro caso, la localización anatómica mayoritaria fue el lóbulo temporal, aunque seguido muy de cerca por el frontal, el más frecuente según las publicaciones.

En lo que se refiere al estado funcional, la mayoría (71,3%) tenían un PS de 0-1 y el 48% un índice de Barthel >90. Neurológicamente, el 54,9% tenía una puntuación en el test de MMSE ≥ 27 y el 59,8% presentaba algún déficit neurológico.

Un dato a destacar de nuestra población es el tratamiento recibido. Dado que los pacientes presentaban tumores irresecables, la cirugía que se realizó fue mínima, siendo en la mayoría de casos sólo biopsia. Esto puede otorgar un peor pronóstico a nuestra cohorte. En cuanto al tratamiento posquirúrgico, el tratamiento neoadyuvante no forma parte del estándar habitual y también ha podido influir en la evolución de estos pacientes.

6.2 La sangre como fuente de biomarcadores

Los tumores son heterogéneos y cambiantes a lo largo del tiempo, debido al impacto de los tratamientos. Durante su evolución, sufren variaciones genotípicas y fenotípicas que precisarían de una nueva biopsia para ser detectadas. El uso de la biopsia líquida, podría ser apropiado para representar el global del tumor y analizar estos cambios, aunque actualmente aún está en fase de estandarización y eso limita su reproducibilidad (186).

En los tumores del SNC, la biopsia líquida es de vital importancia, ya que se necesita un método mínimamente invasivo para definir las alteraciones moleculares, en las diferentes fases de la enfermedad. Al riesgo que supone obtener tejido cerebral, hay que sumarle que la escasez de la muestra obtenida puede no plasmar las características del tumor en su totalidad.

En el momento del diagnóstico, aunque, en estos tumores, el primer tratamiento es siempre una cirugía, en algunos escenarios, la definición previa de biomarcadores podría ser de gran utilidad para el planteamiento terapéutico. Así, en pacientes ancianos, en los que el acto quirúrgico implique una elevada comorbilidad, el diagnóstico del tipo tumoral y los factores biológicos,

pronósticos y predictivos, podría ser determinante para la toma de decisiones. Del mismo modo, esto sería conveniente para valorar la extensión de la resección, en situaciones en que una cirugía máxima pueda ser compleja. Por ejemplo, en un paciente joven con factores de buen pronóstico, es probable que se optara por una cirugía más amplia.

Posteriormente, el manejo clínico de los pacientes con GB, puede requerir de la monitorización de la enfermedad, en distintas fases de su evolución. En muchas ocasiones, durante la valoración de la respuesta al tratamiento, y en los seguimientos, mediante pruebas de imagen, surgen dudas que no se pueden resolver con las técnicas complementarias habituales. En estos casos, se plantea la necesidad de una rebiopsia que confirme el estado de la enfermedad (progresión o pseudoprogresión, por ejemplo). La revaloración de los cambios en las características moleculares del tumor, también puede ser beneficiosa para el estudio de las resistencias a fármacos y el desarrollo de nuevas terapias contra éstas.

La búsqueda de biomarcadores en biofluidos, con el fin de hallar una alternativa a la biopsia, ha sido y es objeto de constante investigación. El LCR, debido a su localización e íntimo contacto con el SNC, se ha postulado como un líquido prometedor para el análisis genómico en tumores cerebrales, tanto primarios como metástasis (241). La baja concentración proteica del LCR normal permite detectar, precozmente, una situación patológica, en caso de encontrarse alteración de estas proteínas o aparición de algunas normalmente ausentes. Este hallazgo se puede producir por rotura de la barrera hemato-encefálica, la secreción proteica intratecal o la diseminación desde el parénquima cerebral. Diversos estudios han utilizado el LCR como biopsia líquida en pacientes con tumores cerebrales, demostrando una mayor concentración de ctDNA en éste que en plasma (230, 232) e, incluso, una mayor sensibilidad para la detección de la metilación del promotor de *MGMT* (242). Aun así, su obtención tiene unos riesgos añadidos que dificultan su uso. La extracción de LCR, mediante una punción lumbar, puede desencadenar complicaciones potencialmente letales, como el enclavamiento en pacientes con hipertensión intracraneal y, en punciones repetidas, infección y hemorragia (243).

La sangre es otro líquido biológico con gran interés como fuente de biomarcadores. El primer estudio, en el que se analizó DNA libre, en sangre de pacientes con cáncer, se publicó en 1977 (178). En él, se describió una correlación entre la disminución de la concentración de DNA en sangre y la respuesta al tratamiento. Diversas publicaciones posteriores, han utilizado la sangre para la detección de DNA tumoral, mRNA y proteínas, resultando un biofluido eficaz en el análisis

de biomarcadores en distintos tumores extracraneales, con una elevada correlación con el tejido tumoral (202, 205, 221, 244).

Aunque muchas veces los conceptos suero y plasma se utilizan como sinónimo de sangre, el suero no tiene factores de coagulación ni células, mientras que el plasma sólo está libre de células. Esta confusión que se genera en los términos, dificulta la búsqueda de bibliografía en la que se especifique, correctamente, el componente utilizado. Por otro lado, hay muy pocos estudios en que se comparen ambos. En un estudio en pacientes con cáncer de pulmón en que se diferenciaban los dos elementos, se determinó una menor sensibilidad del suero en comparación con el plasma. Curiosamente, la cantidad de DNA circulante fue mayor en suero, pero este material genético provenía de las células sanas y no de las tumorales (245). Esta mayor cantidad de ctDNA en suero, frente al plasma, había sido previamente mencionada en diversas investigaciones, tanto en individuos sanos, como en pacientes oncológicos (246, 247). Parece ser, que el DNA no tumoral del suero podría proceder del proceso de la lisis de glóbulos blancos, durante el proceso de coagulación (246). Así pues, probablemente, la concentración elevada de DNA normal, en suero, hace que el ctDNA quede más diluido y sea más compleja su detección.

En nuestro proyecto previo, en el que se determinó la metilación del promotor de *MGMT* por MSP, la muestra sanguínea (suero o plasma) se trató como “sangre” en global, sin distinguir entre ellas. En el proyecto en el que se centra esta tesis, es decir, el análisis mediante pirosecuenciación, se decidió tratar por separado las muestras de suero y plasma. Esto se realizó con el fin de hallar si había diferencias entre los resultados en ambas muestras.

Nuestros resultados, muestran diferencias significativas entre los resultados del suero y del plasma. Los porcentajes de metilación del promotor de *MGMT* en suero, eran claramente menores y, mientras que la determinación en plasma demostraba un impacto en la SG y la SLP, en suero no se objetivó ninguna relación. Es más, el porcentaje que se obtuvo en suero era inferior al “punto de corte técnico” e, incluso, al de las muestras de controles no patológicos. Por tanto, el haber utilizado estas dos muestras por separado añade interés al estudio, ya que nos ha permitido profundizar en nuestros resultados.

Actualmente, ningún biofluido ha demostrado ser equivalente a la propia biopsia, en cuanto a sensibilidad y especificidad. No obstante, la biopsia estándar presenta importantes inconvenientes. Al riesgo de complicaciones y la no representación de la heterogeneidad,

comentados previamente, se suman inconvenientes prácticos, como la mayor inversión de tiempo e infraestructura, el coste añadido y la preservación y almacenamiento del tejido.

La sangre, no sólo subsana el problema de la heterogeneidad sino que la mínima invasividad para su obtención es otra gran ventaja, tanto frente a la biopsia como al otros biofluidos. Esta accesibilidad y facilidad para su extracción, permite su uso repetido en el diagnóstico y la monitorización, por lo que se trata de un líquido excelente para el uso como fuente de ctDNA. Así pues, teniendo en cuenta esta afirmación y los datos previamente publicados, se escogió la sangre como biofluido para el estudio que nos concierne.

Después de la realización de este proyecto, consideramos que, aunque nuestra investigación corrobora que la sangre no puede sustituir al tejido, el uso de la sangre como fuente de biomarcadores debería ser una práctica a seguir utilizando y a incorporar, no sólo en ensayos clínicos, sino también en la rutina clínica diaria. Para ello, se precisa de nuevas tecnologías que discriminen estos biomarcadores y entender como el conocimiento de éstos pueden beneficiar a los pacientes.

Aunque nosotros hemos utilizado la sangre como biofluido, bajo nuestro punto de vista, una estrategia válida sería realizar la primera determinación (fase diagnóstica) en el LCR, debido a su mayor sensibilidad, mientras que en el seguimiento sería más adecuada la muestra sanguínea, dado que se puede repetir con mayor facilidad. La sangre permite una verdadera monitorización a tiempo real.

6.3 Estudio del ctDNA como biomarcador en sangre

Para que los biomarcadores circulantes sean útiles en la clínica, deben ser altamente específicos del tumor y estar presentes en concentraciones detectables. El material genético de las células tumorales (ctDNA) se diferencia del DNA de células normales, presentes en el mismo biofluido, por presentar mutaciones propias del tumor. Este hecho, hace que sea un biomarcador muy específico (248). Así pues, un punto fuerte del uso de ctDNA, en comparación con otros biomarcadores, es la menor probabilidad de resultados falsos positivos.

El ctDNA es un marcador que refleja la genética del cáncer del que proviene y se ha relacionado con el volumen tumoral (249). Ha sido analizado en múltiples tipos de cáncer, ya sea en la fase de

diagnóstico, seguimiento o valoración de respuesta al tratamiento. Su breve vida media (2 horas) le permite reflejar procesos sucedidos en un corto plazo. Es decir, los incrementos de ctDNA se producen rápidamente ante la progresión tumoral, así como el correspondiente declive tras una cirugía o la respuesta a un fármaco. Los cambios pueden detectarse, incluso, de manera previa a las alteraciones en la imagen radiológica (226). Esta característica, le otorga un especial interés en la monitorización a tiempo real, frente a otros biomarcadores.

En resumen, estas particularidades diferenciales del ctDNA frente a otros biomarcadores, lo convierten en uno de los preferidos para el análisis de características moleculares en sangre, con una alta precisión, especificidad y sensibilidad (250).

En nuestro proyecto, la baja concordancia entre los resultados obtenidos en tejido y en plasma podría llevar a diferentes especulaciones. Una de ellas, sería que los GB, debido a la estructura de la barrera hemato-encefálica, no vierten DNA al torrente sanguíneo (251). No en todos los tumores se ha detectado ctDNA en sangre, de hecho, su concentración en sangre se ha relacionado con el tipo y la carga tumoral o estadio (a mayor diseminación del tumor, mayor probabilidad de detección de DNA en sangre) (178, 221, 230). De hecho, en estudios con pocos casos de pacientes con tumores del SNC o metástasis cerebrales, se ha objetivado una baja carga de ctDNA en plasma (196, 223, 229, 231, 232). No obstante, en pacientes con glioma de alto grado, se ha demostrado que la rotura de la barrera hemato-encefálica facilita el paso de ctDNA al torrente sanguíneo.

Nuestro equipo lleva años trabajando con ctDNA en sangre de pacientes con tumores cerebrales primarios (155, 252, 253). En 2003, se publicó el primer estudio en el que se valoró la metilación del promotor de *MGMT* en sangre y tejido de pacientes con GB, así como otros genes. Aunque únicamente se analizaron 21 casos con datos pareados, la concordancia del estado de metilación de *MGMT*, por MSP, fue elevada. Por otro lado, los pacientes que presentaban metilación de *MGMT* según el resultado en sangre, se correlacionaban con una mejor supervivencia. Posteriormente, otros investigadores han apoyado el uso del ctDNA en sangre, como fuente para la detección diversas alteraciones moleculares, como la metilación del promotor de *MGMT* (155, 176, 223, 224). Debido al manejo y conocimiento previamente adquirido por nuestro grupo, a los resultados publicados por otros y a todos los puntos expuestos a su favor, se decidió utilizar el ctDNA en este proyecto.

Uno de los objetivos de esta investigación, era validar el uso de la biopsia líquida, para lo cual era importante encontrar una buena correlación entre los resultados en tejido y en sangre. Todos los pacientes analizados tenían enfermedad detectable y captante de contraste por RM, debido a la rotura de la BHE, en el momento de la extracción sanguínea. Esto sugiere que, esos tumores deberían verter DNA a la sangre. De hecho, en nuestro análisis del estado de metilación del promotor de *MGMT*, se corroboró la presencia de ctDNA en sangre con ambos métodos (MSP y pirosecuenciación). No obstante, la correlación entre muestras fue discreta con ambas técnicas, tanto al comparar M-MSP-S con M-MSP-T como M-PIR-P con M-PIR-T.

Una explicación a estos resultados es la complejidad de la detección de ctDNA. El ctDNA vertido a la sangre son pequeños fragmentos de 180-200pb, ya que esa es la longitud aproximada de la cadena de DNA que se encuentra protegida por la estructura del nucleosoma, y las roturas tienen lugar en el espacio internucleosomal. El avance en las nuevas técnicas, basadas en secuenciación, ha mejorado discretamente su detección, aunque sigue suponiendo uno de los principales retos para el uso de este biomarcador (173). El desarrollo de nuevos métodos para el análisis de ctDNA en sangre, permitirá mejorar, en un futuro cercano, sus limitaciones en referencia a su detección.

6.4 Elección de la pirosecuenciación

Como se ha comentado en profundidad en esta tesis, la metilación del promotor de *MGMT* es un fenómeno ampliamente estudiado, que ha demostrado tener un papel pronóstico y predictivo en los pacientes con GB. Este hecho, hace que cada vez sea más importante su análisis y la fiabilidad del resultado obtenido. Aunque la detección del estado de metilación, en tejido, es un estándar en GB, tanto en la práctica clínica como en investigación, esta prueba sigue siendo imperfecta.

La interpretación de los datos resultantes del análisis de metilación, por cualquier técnica, comporta diferentes complejidades. Entre ellas, se encuentran con las intrínsecas del propio método y de las muestras, desde su procesamiento hasta su conservación (254). La detección del patrón de metilación (heterogeneidad u homogeneidad) es otro de los puntos a tener en cuenta.

Las características diferenciales, de cada una de las técnicas, son las que nos deben ayudar a decidir cuál es la más adecuada. Previamente, en el apartado 1.2.2, se ha comentado ampliamente los aspectos destacables de los diversos subtipos de tecnologías basadas en amplificación por PCR. La principal distinción entre ellas, es el uso de cebadores específicos para

la detección de metilación, o, por el contrario, de cebadores independientes del estado de metilación. El primer grupo, se llaman también “específicas de metilación”, mientras que las que componen el resto de grupos reciben el nombre de “no específicas de metilación”. Mediante los métodos “no específicas de metilación” podemos realizar diferentes valoraciones: analizar todos los fragmentos de DNA generados por la PCR (amplicones), de manera global; estudiar cada CpG de manera individual, con la obtención de un valor promedio; o secuenciar cada uno de los amplicones, de manera individual, con una lectura de cada alelo por separado.

La MSP, con las condiciones y cebadores utilizados por Esteller y colaboradores (149), ha sido, y es, la técnica utilizada en la mayoría de los ensayos clínicos, y, por tanto, la más conocida. Los resultados obtenidos, en tejido de pacientes con GB, sugieren una buena correlación entre el estado de metilación del promotor de *MGMT* y la supervivencia y respuesta a alquilantes (51, 149-151, 155, 253, 255). Los cebadores utilizados están diseñados específicamente para analizar las secuencias de las posiciones CpGs 76-80 y 84-87 del promotor de *MGMT*.

Este método, en sus inicios, tenía como comparador la secuenciación de Sanger, sobre la que la MSP tenía claras ventajas. Estos puntos a favor de la MSP eran la simplicidad, la reducción del tiempo empleado (4-6horas, en lugar de días), el menor coste de los reactivos y la mayor sensibilidad en la detección de metilación (163).

No obstante, con el tiempo, la MSP ha ido mostrando diferentes inconvenientes. Para empezar, una conversión incompleta de citosinas no metiladas a uracilos, durante el tratamiento con bisulfito, puede llevar a obtener resultados falsos positivos (165). Además, se trata de un proceso no automatizado y con lectura subjetiva, hecho que aumenta la probabilidad de que los resultados sean imprecisos (Figura 59).

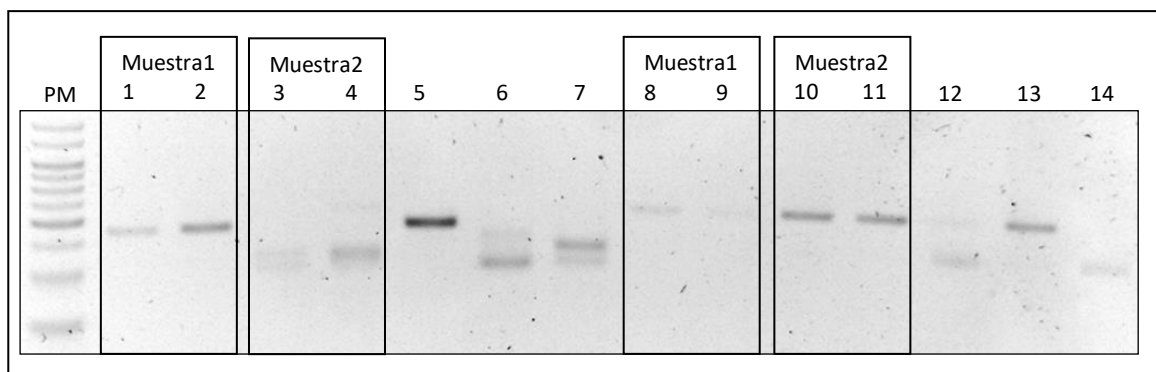


Figura 59. Muestras en gel de agarosa al 2,5%, analizadas por MSP. (Descripción de columnas igual que en la **Figura 45**). En este caso, se objetiva la imprecisión de las bandas, por ejemplo, en la columna **1** y **8**, para la muestra 1.

Como se ha comentado previamente, la MSP ofrece unos resultados cualitativos, no cuantitativos. Así, la intensidad de la banda obtenida en el gel, no tiene correlación con el grado de metilación de la muestra. Por otro lado, el hecho de ser una técnica “específica de metilación” conlleva la imposibilidad de detectar una metilación parcial de las CpG analizadas. En consecuencia, con este método, únicamente se detectan patrones homogéneos de metilación. En nuestro estudio de la metilación de *MGMT*, en tejido, mediante pirosecuenciación, hemos podido objetivar esta heterogeneidad entre las 5 citosinas analizadas. En 14 del total de 74 casos, la diferencia entre el porcentaje mayor y el menor de las 5CpGs de una misma muestra era $\geq 25\%$. Estos hallazgos nos hacen pensar que, algunos de estos casos, en que no todas las CpG estuvieran metiladas, podrían valorarse como no-MET por MSP.

A continuación se muestran algunos ejemplos:

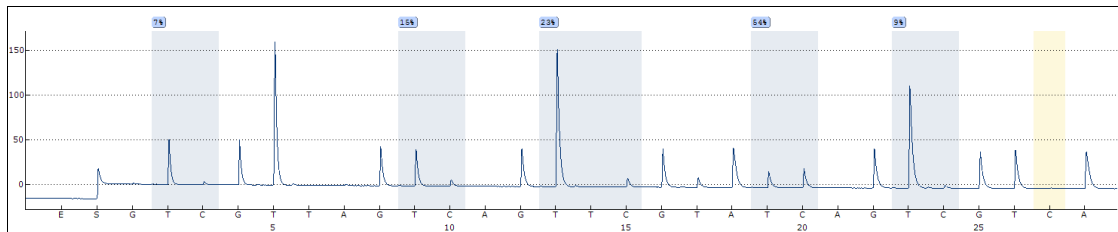


Figura 60. Pirograma con heterogeneidad de metilación en las CpGs analizadas. Véase la primera CpG con un porcentaje de metilación de 7%, mientras que éste es de 54% en la cuarta.

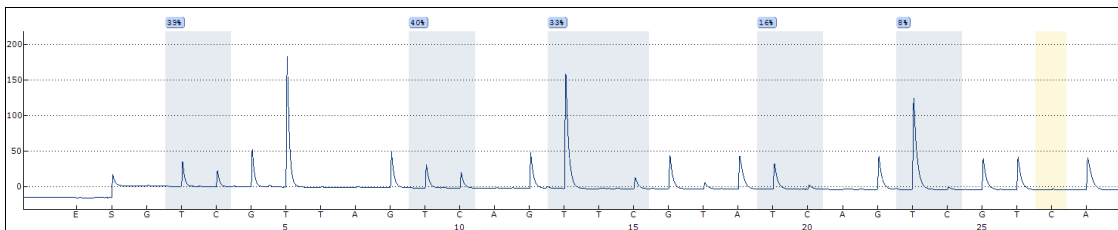


Figura 61. Pirograma con heterogeneidad de metilación en las CpGs analizadas. Véase la última CpG con un porcentaje de metilación de 8%, mientras que en las tres primeras CpGs se encuentra entre 33 - 40%.

Este inconveniente técnico es, probablemente, el más importante a nivel clínico, ya que la imposibilidad de detectar una metilación parcial del promotor podría llevar a no detectar un paciente con cierto grado de metilación y con posible beneficio al tratamiento con alquilantes. Por este motivo, con el tiempo, y al objetivar la heterogeneidad de la metilación del promotor de *MGMT* (235, 256), se empezó a plantear que esta técnica probablemente no sería la más adecuada (109, 143, 257) (Figura 62).

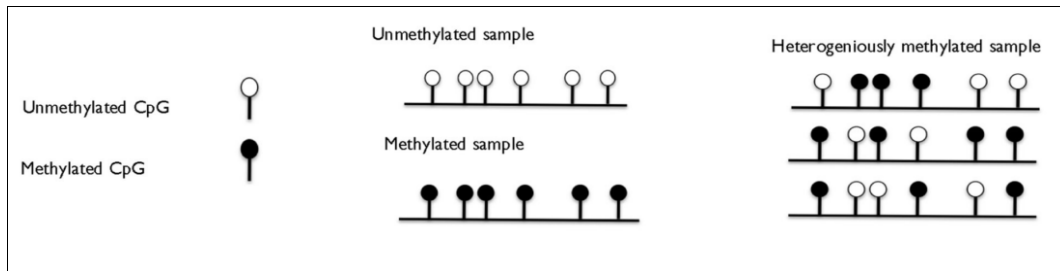


Figura 62. (Extraída de (254)) en la que se muestra los 3 estados posibles de metilación del locus: totalmente metilado, totalmente no metilado y metilado heterogéneamente.

Las técnicas “no específicas de metilación”, entre las que se encuentra la pirosecuenciación, se caracterizan por poder detectar esta heterogeneidad tumoral y cuantificar, o semicuantificar, el grado de metilación (254). A diferencia de la MSP, que es una técnica con valoración subjetiva y con resultado dicotómico (MET o no-MET), la pirosecuenciación es objetiva y da resultados en forma de porcentaje. Con el fin de intentar subsanar el inconveniente de no poder cuantificar la metilación de *MGMT*, por MSP, en la literatura, se ha propuesto una variación de ésta, llamada MSP en tiempo real o semicuantitativa (SQ-MSP). Aunque es una técnica más compleja y la cuantificación del grado de metilación es aproximada, el análisis de la metilación de *MGMT* mediante este método se ha relacionado con el pronóstico (258).

Otras particularidades, a tener en cuenta en la elección de un método, es su reproducibilidad, rapidez, estandarización, facilidad de interpretación y coste. La pirosecuenciación es un proceso sencillo y rápido, con capacidad de análisis de varias CpG y en un gran número de muestras al mismo tiempo. Requiere de unas 3 horas, teniendo en cuenta el tiempo dedicado a la PCR previa, pudiendo analizarse 21 muestras a la vez (24 con los controles). La interpretación de las gráficas, una vez establecido el punto de corte, es sencilla.

En una publicación, se compararon los resultados de metilación del promotor de *MGMT* en glioma mediante pirosecuenciación, MSP y MS-MLPA (236). La pirosecuenciación resultó equivalente a la MSP en cuanto a la predicción de la SLP y fue el único método que pudo predecir la SG. La relación entre la supervivencia y el estado de metilación del promotor de *MGMT*, mediante pirosecuenciación, se ha ratificado en otras investigaciones (236, 237, 256, 257, 259-264). Es más, incluso ha demostrado una mejor correlación al compararse con técnicas previamente utilizadas, como la MSP, IHQ, MS-MLPA (235, 236, 238, 260, 262), destacando su elevada especificidad y sensibilidad (165, 235).

En la figura 63 se muestran diferentes métodos para el estudio de la metilación del promotor del gen *MGMT* y las CpGs analizadas en cada uno de ellos.

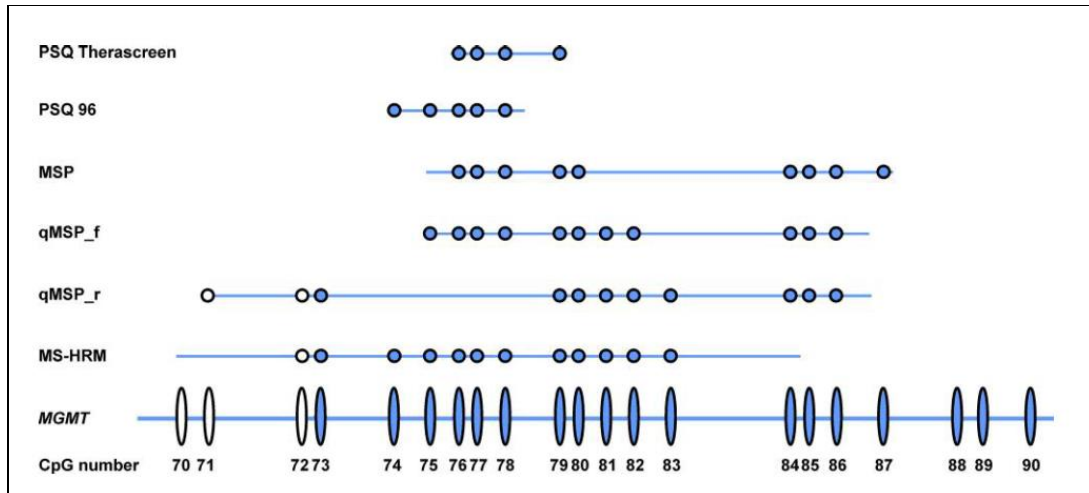


Figura 63. (Extraída de (265)). Análisis de CpGs del promotor de *MGMT* con diferentes técnicas. Los círculos representan CpGs. Abreviaturas: PSQ: Pirosecuenciación, MSP: PCR específica de metilación, qMSP: MSP semicuantitativa, MS-HRM: Análisis metilación- específica de fusión de alta resolución.

La reproducibilidad es otro de los criterios a considerar para decantarse por una técnica, entendiendo por reproducibilidad la robustez de la prueba. En este aspecto, Preusser y colaboradores llevaron a cabo un ensayo comparando los resultados obtenidos con pirosecuenciación a nivel intra e inter-laboratorios (264). Sus resultados mostraron una correlación perfecta entre las determinaciones del estado de metilación del promotor de *MGMT* (100% concordancia), independientemente del laboratorio en el que se realizara. Así pues, se concluyó que la técnica tiene una excelente reproducibilidad y repetitividad, es decir, una elevada concordancia entre medidas repetidas de una misma muestra, en un mismo laboratorio, equipo y personal técnico.

Del mismo modo, muchos estudios han demostrado que esta robustez es posible en muestras parafinadas de GB. Estos datos, añadidos a su mayor sensibilidad, fiabilidad y a su estandarización, lleva a que se haya postulado como una técnica superior al resto, concluyendo que probablemente debería tomarse la pirosecuenciación como la técnica de referencia (156, 235-238, 257, 259-262, 264, 266-271). De hecho, en algunas guías, la han postulado como método recomendado para el análisis de la metilación del promotor de *MGMT* en gliomas (272).

Así pues, debido a estos resultados previamente publicados en la literatura, nuestro equipo decidió el uso de la pirosecuenciación para el detectar la metilación del promotor de *MGMT* en ctDNA en tejido y sangre.

En nuestro análisis de pirosecuenciación en tejido, aun teniendo menor número de muestras, y aunque éstas pudieran estar, presuntamente, más degradadas, se obtuvieron un mayor número de muestras valorables (ver datos en resultados). Dado que, en la pirosecuenciación, se precisa de menos cantidad de DNA, en comparación con la MSP, es posible que la muestra utilizada en la primera técnica tenga, también, menor cantidad de inhibidores que interfieran en la amplificación.

De las discrepancias entre los resultados del tejido, podemos profundizar en diversos puntos. Por una parte, 3 no-MET por pirosecuenciación, obtuvieron resultado de MET por MSP. Se ha descrito el hallazgo de falsos positivos al analizar muestras de parafina por MSP. Estos falsos positivos se producen, básicamente, por la conversión incompleta de citosinas a uracilos con el tratamiento de bisulfito y por modificaciones introducidas por el formol (273).

Otro dato a destacar es que 8 casos detectados como no-MET por MSP, tuvieron un resultado MET utilizando la pirosecuenciación. Es probable que los resultados se deban a una falta de detección, por MSP, de una muestra con metilación parcial de sus CpGs. Como se ha comentado previamente, la pirosecuenciación, al contrario de la MSP, permite analizar distintas CpG de manera individual, por lo que permite diferenciar muestras parcialmente metiladas. Del mismo modo, la dificultad de interpretación de la positividad o no de una banda visualizada en la MSP, también puede haber influido en estos resultados. Es decir, una banda tenue, puede haber sido interpretada como negativa, siendo, en realidad, positiva.

Estos datos comentados, en los que la pirosecuenciación detectaba más MET que la MSP, nos plantearon la duda de si un test podía ser complementario al otro. De ser así, en los casos no-MET por MSP, se podría realizar la determinación por pirosecuenciación para obtener un resultado definitivo. No obstante, no se objetivaron diferencias en supervivencia entre aquellos pacientes determinados como MET o no-MET por ambos métodos al compararlos con los que lo eran sólo por uno de ellos. Así pues, con nuestros resultados, no podemos aconsejar el uso de las dos técnicas de manera complementaria, pero sí recomendamos utilizar la pirosecuenciación en los casos en que la MSP no obtiene un resultado valorable.

Con nuestros resultados en tejido, podemos concluir que la metilación del promotor de *MGMT* en tejido, mediante pirosecuenciación, es más específica (90 vs 75%) y tiene un mayor VPP (91% vs 78%) que la MSP. Por otro lado, la MSP ha resultado ser más sensible (91% vs 78%) y tener mayor VPN (90% vs 75%). Estos datos no van de acuerdo con la literatura presentada, en la que la pirosecuenciación se planteaba como una técnica más sensible. Los resultados en sangre tuvieron una baja sensibilidad con ambas técnicas, mientras que la especificidad fue mayor con MSP (96% vs 76%).

Esto nos hace plantear qué características son las primordiales a la hora de elegir una técnica. Está claro, que la reproducibilidad es una de ellas. La pirosecuenciación es una técnica objetiva, hecho que ayuda a una mejor reproducibilidad y, como se ha explicado, hay estudios que han objetivado que esta una buena capacidad de repetición entre laboratorios y entre diferentes técnicos de un mismo laboratorio.

En cuanto a la validez diagnóstica de una prueba, la pregunta es si tiene más valor la especificidad o la sensibilidad.

Actualmente, se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos que discriminan a los pacientes, según su estado de metilación, a recibir un tratamiento u otro (274, 275). Algunos de ellos, incluso cambia el estándar de primera línea para pacientes sin metilación del promotor de *MGMT*, de modo que, en lugar de recibir tratamiento con alquilantes, se tratan con un fármaco alternativo. Así pues, puesto que la implicación de un falso negativo puede hacer que un paciente no reciba un tratamiento que podría ser beneficioso (fármaco alquilante), parece claro que se precisa de un método con alta especificidad. El tratamiento con TMZ en pacientes con GB, es el único que ha demostrado una mejoría en SLP y SG, por lo que prescindir de su uso, en un paciente con metilación de *MGMT*, podría tener un impacto trascendental. Por el contrario, en caso de que una técnica sea menos específica, se podría clasificar un caso no-MET en MET. La implicación de este supuesto no se traduciría en evitar un tratamiento con potencial beneficio, así que el error no tendría tanto impacto sobre el paciente.

6.4.1 Selección de CpGs

Una de las preguntas abiertas para el estudio de la metilación de *MGMT*, mediante pirosecuenciación, es cómo elegir las CpG a analizar. La duda no se basa únicamente en cuántas, sino también en qué posiciones, así como si tiene impacto escogerlas consecutivas o aleatoriamente. Seleccionar más de una posición de citosina, nos lleva también a plantearnos si todos los sitios tienen la misma relevancia. La mayoría de estudios, usan la media entre los porcentajes obtenidos en las CpG analizadas, pero otros intentan discernir entre aquellas que podrían tener mayor influencia en el pronóstico.

Hasta el momento actual, el número de CpGs analizadas en la literatura va desde 4 a 62, y el punto de corte desde 2,7% a 35% (109, 156, 235, 256, 266, 276, 277). Debido a que no hay consenso sobre la región más relevante para analizar la metilación de *MGMT*, a continuación, se resumen los datos obtenidos en varias investigaciones, para resolver esta duda.

La metilación del promotor de *MGMT* en la región más ampliamente estudiada, la que comprende las posiciones de CpGs entre la 74 y la 78, ha mostrado correlación con el pronóstico de los pacientes con nuevo diagnóstico de GB (236, 237, 259-262). La mediana de metilación de la región que contiene CpG 74-89 influye significativamente en la SG (256, 257, 263). Como se ha comentado previamente, el perfil de metilación observado es frecuentemente heterogéneo, las CpGs 84, 89 y las medianas de 84-88, 74-78 y 76-80 han mostrado una estrecha relación con la SLP y SG en un estudio (256), así como las CpGs 85 y 87 en otro (263). Las posiciones 25-50 y 72-90 se correlacionan con la transcripción del gen y las 72-90, localizadas en el exón 1, parecen jugar un papel crítico en la actividad del promotor (143, 267).

En vista de los resultados obtenidos previamente, en los que se concluía que diferentes citosinas podían tener un impacto pronóstico, un estudio más reciente decidió comparar combinaciones de distintas citosinas (278). Así pues, se eligieron 86 casos con información sobre la metilación en las CpGs 75-82, y 48 casos con información de las CpGs 72-78. Aunque no todas las muestras eran de GB, sino que también se incluían gliomas grado III, todos ellos fueron tratados con el mismo esquema de tratamiento (TMZ y RT), y de todos ellos se tenía información sobre SG. Este estudio concluyó que, la combinación de 4 citosinas, tenía similar correlación con la expresión de mRNA de *MGMT*, en comparación con más de 4, y era suficiente para predecir la expresión del gen. Así mismo, también se determinó que el valor predictivo de las CpGs 75-78 era parecido al de las

CpGs 76-79 y 74-78, por lo que los kits comerciales eran prácticamente equivalentes, en cuanto a su correlación con la expresión de *MGMT*, y el impacto en la supervivencia en pacientes tratados con TMZ.

En conclusión, las posiciones CpG 72-83, 72-80, 72-77, 74-78, 74-89, 76-79 y 80-83 han sido utilizadas, para el análisis de la metilación de *MGMT*, por pirosecuenciación, en diferentes estudios (109, 143, 235, 237, 257, 260, 262, 277, 279). No obstante, la combinación de citosinas más utilizadas en la actualidad, por haber demostrado un valor clínico más relevante, son las que se encuentran en las CpGs 76-79 y 74-78, y se incluyen en los kits comerciales de Qiagen. Las 74-78 son las visualizadas en nuestro proyecto.

En la figura 64 se muestra los sitios CpGs más ampliamente estudiados y los pertenecientes a los kits comerciales.

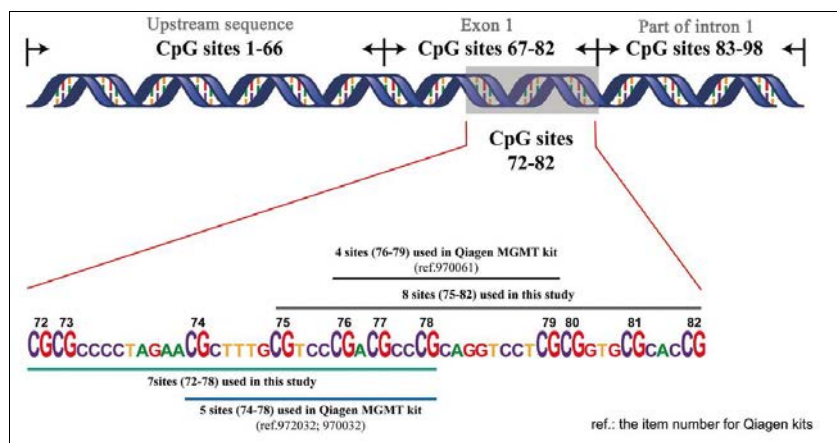


Figura 64. (Extraída de (280)) Distintas posiciones de CpGs de la isla de CpGs del promotor de *MGMT*.

Por consiguiente, para nuestro estudio con pirosecuenciación, se decidió utilizar el kit “Pyromark®Q24 CpG *MGMT*” con las citosinas 74 a 78, parcialmente superponibles a las estudiadas por MSP (CpG 74-78 y 84-87). Se analizaron los datos de cada una de las citosinas y su media. Aunque la media puede enmascarar la heterogeneidad en el patrón de metilación, se trata de un valor más estable.

En nuestro proyecto, tal y como había estado descrito previamente, el análisis de las CpGs 74-78 del promotor de *MGMT*, en tejido, fue predictivo de respuesta y factor pronóstico (tanto en SLP como en SG) con ambas técnicas.

6.4.2 Punto de corte

El primer reto que se tuvo que resolver, una vez obtenido el porcentaje de metilación de *MGMT* en cada una de nuestras CpGs, fue determinar el umbral en el que se consideraba que el valor tenía impacto clínico para considerar una muestra como positiva o negativa para metilación.

Uno de los problemas en la interpretación de los resultados generados por las técnicas cuantitativas, es su traducción a resultados binarios. Algunos métodos carecen de punto de corte establecido, que nos determine una muestra como MET o no-MET. Aunque el punto de corte para la detección de metilación de diversos genes, por pirosecuenciación, está establecido, a día de hoy, no hay un valor inequívoco para determinar el estado de metilación del promotor del gen de *MGMT*. Esta limitación, ha sido el tema de diversos estudios en diferentes tumores, aunque, como consecuencia de su impacto predictivo y pronóstico, ha adquirido especial interés en tumores cerebrales (256, 279-283).

Diferentes estudios han intentado determinar este punto de corte, a partir de estrategias distintas. En nuestro proyecto, inicialmente, se intentó hallar el “punto de corte técnico”. El proceso llevado a cabo para ello, fue la determinación de la metilación de *MGMT*, por pirosecuenciación, en controles con DNA no metilado comercial. La media de metilación de las 5 CpG en los 13 controles fue de 2,88% (+/- 0,71). Este valor fue el que se estableció como “punto de corte técnico” y cualquier porcentaje inferior a él, se consideró no metilado. Este proceso no se ha hecho en otros estudios.

Debido a que la metilación del DNA es específica del tejido analizado, algunos investigadores han valorado la metilación de *MGMT* en tejido cerebral sano. Los porcentajes de metilación media en muestras de cerebro se han situado en el 5% (análisis en 2 muestras), 8% (5 muestras) y entre 0 y 10% (número de muestras no especificadas) (236, 266, 269).

En nuestros análisis de 37 muestras de tejido no patológico, se utilizó tejido cerebral normal, tejido de otros órganos (colon) y células sanguíneas (linfocitos). Este estudio, con muestras de tejido de distinto órgano, tampoco se había realizado previamente. Aunque el número de muestras analizadas de un mismo tejido no es muy amplio, la información que se ha podido extraer es interesante. El colon y los linfocitos han mostrado un porcentaje de metilación menor o cercano al del “punto de corte técnico”, por lo que el resultado sería no-MET. En el cerebro si se

ha observado un cierto grado de metilación del promotor de *MGMT*. En 5 muestras de cerebro normal, con una media de metilación de 3,7, se separaron la sustancia gris y la blanca. La media de metilación de *MGMT* en la sustancia gris fue de 3,2, mientras que en la blanca fue de 8,5. Este dato tiene dos puntos de interés. Por un lado, no se había descrito previamente y por otro, sugiere que al analizar el cerebro en global, sustancia blanca y gris, el mayor grado de metilación de *MGMT* en la sustancia blanca puede quedar diluida. Esta posibilidad de dilución de la muestra es algo que no se ha comentado anteriormente. En muchos casos, al analizar una muestra de GB, la selección de las zonas tumorales es complicada, más aún en casos en el que las células tumorales y sanas se mezclan (284). Así pues, el DNA extraído de las células no tumorales y, por tanto, sin o con escasa metilación de *MGMT*, se mezcla con el tumoral, con riesgo de infraestimación del porcentaje de metilación. En nuestras muestras, hemos confirmado un mínimo de 80% de tejido tumoral, pero hay que valorar que el margen del 20% restante puede alterar los porcentajes de metilación obtenidos, por lo que sería más adecuado que el punto de corte comprendiera un rango.

Seguidamente, se inició la búsqueda del punto de corte con valor clínico. Para ello, se correlacionaron los porcentajes de metilación de las muestras con la SG, y se buscó el punto con significación estadística que distinguía dos grupos con las máximas diferencias en supervivencia. A este punto de corte le llamamos “mejor punto de corte”. Este valor fue de 11,4% en las muestras de tejido y de 3,4 en plasma. Este es uno de los análisis realizados en investigaciones precedentes. Valores $\geq 9\%$ se han considerado MET en una de ellas (269), así como 11,5-14% (236). Parece que el valor más repetido entre 8% y 10% (235, 266). Más allá de definir un único valor, algunos autores, han tenido en cuenta el concepto de “zona gris”, aplicándolo a distintas técnicas (255). Éste se refiere a cierto grado de metilación de las muestras, que les sitúa entre MET y no-MET, y que, aún siendo inferior a un punto de corte, podría tener un impacto clínico para el paciente. Así, concluyen que el valor alrededor del 10%, utilizado como punto de corte en muchos estudios, estaría sobrevalorado, y pacientes con un porcentaje inferior de metilación ya se podrían beneficiar de un tratamiento con alquilantes (266, 277).

Análisis posteriores, ha utilizado el límite de 9%, aunque las citosinas (en número y posición) estudiadas sean diferentes a las utilizadas para definir ese punto de corte, asumiendo que todas las citosinas tienen un mismo valor (266). Obviamente, las citosinas seleccionadas deberían influir en la elección del punto de corte de metilación medio entre ellas. En general, en los estudios previos, el valor establecido varía en un rango desde 2,68% hasta 30%, según la combinación de

citocinas estudiada (235, 237, 266, 267, 277). En nuestra cohorte, las citosinas analizadas fueron las de las CpGs 74-78 y se usó la media de éstas para la búsqueda de los puntos de corte.

En una de las investigaciones más recientes, se analizó la metilación del promotor de *MGMT*, en 139 casos de GB, mediante pirosecuenciación y PCR específica de metilación semicuantitativa (SQ-MSP) (279). El punto de corte utilizado fue entre 8% y 12%, de modo que los casos con valores inferiores a 8% se consideraban no-MET y, superiores a 13%, MET. Este punto de corte, se utilizó por resultados previos en una serie retrospectiva del mismo grupo (260). Los datos entre 9 y 12 se consideraban en “zona gris”. Analizando la correlación entre técnicas, concluyeron que el punto de corte con mejor concordancia era 12% en pirosecuenciación y 13% en SQ-MSP. Con este valor se obtenía una concordancia entre técnicas del 98%, mientras que, con el límite de 13% en los dos, la correlación era del 91%. Aunque ambos métodos demostraron correlación entre el estado de metilación y la SG y la SLP, la SQ-MSP no tuvo una aceptable reproducibilidad (285). El punto de corte de 12%, determinado por este grupo de investigadores (285), es muy próximo al “mejor punto de corte” que nosotros hemos hallado en tejido (11,4).

A raíz de esta idea de la “zona gris”, se planteó que, probablemente, el punto de corte con mayor interés clínico no fuera aquel que separaba mejor dos grupos de pacientes según su supervivencia, sino aquel a partir del cual el porcentaje de metilación se relacionaba con un mejor pronóstico. Para ello, se analizó el porcentaje de metilación mínimo a partir del cual se objetivaba un impacto en supervivencia. Este valor fue llamado “punto de corte mínimo”, y fue de 5% en tejido y de 3,4 en plasma. Este es un dato que no se ha tenido en cuenta en otras investigaciones, y que aporta importancia al punto de corte en el contexto de la práctica clínica. Así pues, pacientes con valores de metilación inferiores a 11,4%, en concreto, entre 5 y 11,4% serían casos que se podrían beneficiar de un tratamiento con agentes alquilantes. Al fin y al cabo, la trascendencia de la determinación de la metilación de *MGMT* es su valor como factor pronóstico y como predictivo de respuesta a esquemas basados en fármacos alquilantes.

Pese a que se usó la media de las 5 CpGs (74 a 78) para todos estos estudios estadísticos, se quiso analizar como habrían variado los datos si se hubiera determinado el valor de *MGMT* sólo con el “mejor punto de corte” obtenido en una CpG. Este procedimiento se realizó tanto en muestras de tejido, como en plasma. Los datos en tejido, expuestos en las tablas previas (apartado de resultados), muestran datos discordantes (MET/no-MET) al analizar el “mejor punto de corte” de las CpGs, de manera individual, y compararlas con la media del “mejor punto de corte” (11,4%).

Estos casos eran: 6 (CpG74); 7 (CpG75); 7 (CpG76); 4 (CpG77) y 10 (CpG78). No obstante, los casos MET según “mejor punto de corte” de la CpG individual pero no-MET por la media, fueron menos (5 CpG74; 7 CpG75; 2 CpG 76; 0 CpG77 y 4 CpG 78). Se destacan estos valores porque serían pacientes que, aún siendo MET analizando la CpG individual, al usar la media, hubieran sido determinados como no-MET y este dato podría tener repercusión en la actitud terapéutica.

Al hacer la misma operación, pero relacionando los datos con el “punto de corte mínimo” de la media, sólo hubo diferencias en 1 caso MET según el punto “mejor punto de corte” de la CpG 75 y otro en la CpG 78, pero no-MET según el valor mínimo de la media. Se revisó la supervivencia de estos 2 pacientes, siendo ésta de 3 y 6 meses. Valorando únicamente la metilación como factor pronóstico en estos pacientes, se podría sugerir que la supervivencia de estos pacientes es congruente con la de un paciente sin metilación de *MGMT*. En consecuencia, el valor de metilación definido por la media sería correcto.

Para las muestras de plasma se realizó el mismo análisis. En este caso, se utilizaron los datos obtenidos con el “mejor punto de corte” de la media de CpGs y se confrontaron con los de cada una de las CpGs por separado. Únicamente 3 casos fueron MET por el “mejor punto de corte” de la CpG 75 y 1 por la CpG 77, siendo no-MET utilizando la media. También se revisó la supervivencia de estos 4 pacientes, siendo de 7,37 meses, 6,07m, 5,1m y 29,57m. De nuevo, teniendo en cuenta la metilación como único factor pronóstico, se podría apuntar que los 3 primeros casos tienen una supervivencia más acorde con un paciente sin metilación de *MGMT*, mientras que el último se comportaría como un paciente MET. Así pues, mientras que en este último caso tendría un valor el análisis de la CpG de manera individual, no sería así en los otros 3, en los que el resultado fijado por la media sería adecuado.

En resumen, todos estos test hechos con cada una de las CpGs y las medias, nos confirman que pocos casos serían determinados como no-MET, siendo MET según la CpG individual. Esto significa, que se aseguraría que un paciente que pudiera beneficiarse del tratamiento con agentes alquilantes (paciente MET), lo recibiera. Por tanto, el uso de la media de las 5 posiciones de CpG para el estudio de la metilación de *MGMT*, es una buena elección.

Con nuestros datos y los previamente publicados en la literatura, se evidencia que para poder interpretar los datos y otorgar a un caso el valor de MET o no-MET hay que tener en cuenta múltiples aspectos relacionados con la técnica. Estos incluyen, las limitaciones de la propia técnica, las CpGs analizadas, el punto de corte utilizado y su valor clínico.

En conclusión, en nuestro proyecto se definieron tres puntos de corte diferentes, el “punto de corte técnico”, el “mejor punto de corte” y el “punto de corte mínimo”. El valor del “punto de corte técnico”, 2,88 (+/- 0,71%) fue cercano al “punto de corte mínimo”. Por lo cual, se podría deducir que cualquier nivel de metilación superior al “punto de corte técnico” refleja una muestra con cierto grado de metilación y, por tanto, un paciente que podría beneficiarse de un tratamiento basado en TMZ.

6.5 Limitaciones

Nuestro estudio presenta una serie de limitaciones que se enumeran a continuación:

- Se trata de un estudio retrospectivo.

- El tratamiento que recibieron los pacientes, al estar incluidos dentro de un ensayo clínico, no es el tratamiento estándar (esquema Stupp). Por ello, las supervivencias obtenidas no pueden ser comparadas con controles históricos tratados con el esquema Stupp o con los pacientes de la práctica diaria.

- Dado que en la mayoría de los casos de nuestra población, sólo se realizó una biopsia del tumor (sin practicar una resección parcial o completa), la cantidad de tejido disponible fue escasa.

- No se disponía de muestras pareadas (sangre y tejido) de todos los pacientes incluidos y, en algunos casos, las condiciones no eran óptimas para la extracción de DNA (muestras hemolizadas).

- En el estudio previo (con la técnica de MSP) no se diferenció entre suero y plasma, pero en este segundo estudio se analizaron ambas muestras por separado, obteniendo resultados distintos. Ello plantea que los resultados obtenidos mediante MSP podrían haber sido diferentes si se hubieran estudiado suero y plasma separadamente.

- Al haber utilizado las muestras, previamente, para el análisis del estado de metilación de *MGMT*, mediante la técnica de MSP, algunas de las muestras fueron insuficientes para el análisis por pirosecuenciación. Así mismo, las muestras almacenadas, podían estar más degradadas. Si bien también es cierto, que estas alteraciones pueden suponer errores en cualquiera de las dos técnicas (MSP y pirosecuenciación), y precisamente se ha postulado a la pirosecuenciación como una mejor técnica para trabajar en estas condiciones.

6.6 Fortalezas

Nuestro análisis también tiene una serie de fortalezas que deben ser destacadas y que se enumeran a continuación.

- La población estudiada es homogénea.

Todos los pacientes tenían un diagnóstico de GB, con revisión histológica confirmada y con tumores irreseccables. La cirugía que se les practicó fue una biopsia o resección parcial mínima, por lo que tenían enfermedad residual medible, en el momento de la extracción sanguínea. Los pacientes estaban bien caracterizados y tuvieron un seguimiento estricto, ya que estaban incluidos dentro de un ensayo clínico, hecho que asegura que los datos clínicos para determinar el valor pronóstico y predictivo, son auténticos.

- Los controles de calidad del DNA fueron exhaustivos.

Por un lado, se seleccionaron las regiones tumorales, excluyendo el tejido sano y las zonas necróticas. Del mismo modo, se analizó el porcentaje de células tumorales de GB de las muestras de tejido, considerándose óptimo, un porcentaje superior al 80%.

- Se utilizaron tejidos control.

Se valoró tejido no patológico de distintos órganos. En las muestras de cerebro, incluso, se estudiaron la sustancia gris y blanca por separado. Esta diversidad de tejidos no había sido estudiada previamente.

- Se determinaron diferentes puntos de corte, para la pirosecuenciación.

En nuestro proyecto se determinaron 3 puntos de corte para definir el estado de metilación de *MGMT*, mediante pirosecuenciación. Estos fueron el “punto de corte técnico” y dos clínicos: el “mejor punto de corte” y el “punto de corte mínimo”. Ni el “punto de corte mínimo”, definido como el porcentaje mínimo de metilación de *MGMT* con impacto en supervivencia, ni el “punto de corte técnico” habían sido descritos con anterioridad.

- El suero y el plasma fueron analizados de manera individual, lo que permitió extraer conclusiones independientes.

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

Referente al objetivo principal:

1. En pacientes con GB, la pirosecuenciación es una técnica válida para el análisis de la metilación del promotor del gen *MGMT*, en muestras pareadas de tejido y plasma. La pirosecuenciación, ofrece más resultados valorables y detecta más pacientes con metilación del promotor de *MGMT*, al comparar con la MSP.

Referente a los objetivos secundarios:

2.1 El análisis de la metilación del promotor del gen *MGMT*, mediante ambas técnicas, en tejido, se correlaciona con la supervivencia libre de progresión, la supervivencia global y el beneficio clínico a los tratamientos basados en temozolomida. Mediante pirosecuenciación, en plasma, se relaciona con la supervivencia libre de progresión y supervivencia global, pero no con el beneficio clínico. La determinación del estado de metilación del promotor de *MGMT*, mediante MSP en sangre, no tiene valor pronóstico ni predictivo.

2.2 El estudio comparativo de los resultados obtenidos en ambas muestras, con una misma técnica, es decir sangre y tejido mediante MSP y plasma y tejido mediante pirosecuenciación, tiene una baja concordancia.

2.3 La pirosecuenciación es un método más específico y con mayor valor predictivo positivo para detectar la metilación del promotor de *MGMT*, en tejido; mientras que la MSP es una técnica más sensible y con mayor valor predictivo negativo. En el caso de la pirosecuenciación en sangre (suero o plasma), la especificidad, la sensibilidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, no son suficientes para sustituir a la determinación en tejido.

2.4 El punto de corte hallado, para definir una muestra como positiva para la metilación del promotor de *MGMT*, mediante pirosecuenciación, sugiere que cualquier grado de metilación representa un beneficio clínico para los pacientes con GB tratados con esquemas basados en TMZ.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA

8 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA

Consideramos que la pirosecuenciación es una técnica sencilla, rápida y de lectura objetiva. El hecho de que algunas de las muestras que no obtuvieron resultado por MSP, lo hayan tenido con pirosecuenciación, nos hace plantear el uso de la pirosecuenciación en estos casos. Aunque, en nuestro análisis, esto no haya tenido una repercusión en la supervivencia de los pacientes.

Para validar los resultados y comparar las dos técnicas, sería interesante realizar un estudio en el que se analizaran las muestras, con las dos técnicas, al mismo tiempo, de manera paralela.

Dada la importancia que están adquiriendo en el diagnóstico de los tumores cerebrales, sería de interés poder detectar la metilación del promotor de *TERT* y la amplificación de *EGFR* en biopsia líquida. Esta última alteración también tendrá relevancia terapéutica en un futuro inmediato, puesto que en la actualidad hay diversos ensayos clínicos con tratamientos dirigidos frente a esta alteración como diana.

9 FINANCIACIÓN

Esta tesis ha sido financiada por una beca GEINO otorgada a la Dra. Carme Balaña.

BIBLIOGRAFÍA

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Perry A BD. *Practical Surgical Neuropathology: a diagnostic approach*. 1st ed. Philadelphia, PA2010.
2. Sahm F, Capper D, Jeibmann A, Habel A, Paulus W, Troost D, et al. Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis. *Arch Neurol*. 2012;69(4):523-6.
3. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*. 2015;129(6):829-48.
4. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol*. 2018;20(suppl_4):iv1-iv86.
5. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol*. 2014;16(7):896-913.
6. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
7. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, 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(5):459-66.
8. Neglia JP, Robison LL, Stovall M, Liu Y, Packer RJ, Hammond S, et al. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(21):1528-37.
9. Scheurer ME, Amirian ES, Davlin SL, Rice T, Wrensch M, Bondy ML. Effects of antihistamine and anti-inflammatory medication use on risk of specific glioma histologies. *Int J Cancer*. 2011;129(9):2290-6.
10. Ohgaki H, Kim YH, Steinbach JP. Nervous system tumors associated with familial tumor syndromes. *Curr Opin Neurol*. 2010;23(6):583-91.
11. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(4):764-72.
12. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109.
13. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-20.
14. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol*. 2018;136(5):805-10.
15. Han SJ, Yang I, Tihan T, Prados MD, Parsa AT. Primary gliosarcoma: key clinical and pathologic distinctions from glioblastoma with implications as a unique oncologic entity. *J Neurooncol*. 2010;96(3):313-20.
16. Henriksson R, Bergqvist M. *Neuro-Oncology, Essentials for Clinicians*. Rickmansworth, Hertfordshire, UK: ESMO; 2017. 100 p.
17. DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med*. 2001;344(2):114-23.
18. Lescher S, Schniewindt S, Jurcoane A, Senft C, Hattingen E. Time window for postoperative reactive enhancement after resection of brain tumors: less than 72 hours. *Neurosurg Focus*. 2014;37(6):E3.

19. Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S, et al. Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003;24(10):1989-98.
20. Bitar R, Leung G, Perng R, Tadros S, Moody AR, Sarrazin J, et al. MR pulse sequences: what every radiologist wants to know but is afraid to ask. *Radiographics.* 2006;26(2):513-37.
21. Mechtler L. Neuroimaging in neuro-oncology. *Neurol Clin.* 2009;27(1):171-201, ix.
22. Lafitte F, Morel-Precetti S, Martin-Duverneuil N, Guermazi A, Brunet E, Heran F, et al. Multiple glioblastomas: CT and MR features. *Eur Radiol.* 2001;11(1):131-6.
23. Scarabino T, Popolizio T, Trojsi F, Giannatempo G, Pollice S, Maggioletti N, et al. Role of advanced MR imaging modalities in diagnosing cerebral gliomas. *Radiol Med.* 2009;114(3):448-60.
24. la Fougere C, Suchorska B, Bartenstein P, Kreth FW, Tonn JC. Molecular imaging of gliomas with PET: opportunities and limitations. *Neuro Oncol.* 2011;13(8):806-19.
25. Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life.* 2009;2(4):386-93.
26. Kosaka N, Tsuchida T, Uematsu H, Kimura H, Okazawa H, Itoh H. 18F-FDG PET of common enhancing malignant brain tumors. *AJR Am J Roentgenol.* 2008;190(6):W365-9.
27. Yamashita K, Yoshiura T, Hiwatashi A, Togao O, Yoshimoto K, Suzuki SO, et al. Differentiating primary CNS lymphoma from glioblastoma multiforme: assessment using arterial spin labeling, diffusion-weighted imaging, and (1)(8)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Neuroradiology.* 2013;55(2):135-43.
28. Albert NL, Weller M, Suchorska B, Galldiks N, Soffietti R, Kim MM, et al. Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro Oncol.* 2016;18(9):1199-208.
29. Dunet V, Pomoni A, Hottinger A, Nicod-Lalonde M, Prior JO. Performance of 18F-FET versus 18F-FDG-PET for the diagnosis and grading of brain tumors: systematic review and meta-analysis. *Neuro Oncol.* 2016;18(3):426-34.
30. Hutterer M, Nowosielski M, Putzer D, Jansen NL, Seiz M, Schocke M, et al. [18F]-fluoroethyl-L-tyrosine PET: a valuable diagnostic tool in neuro-oncology, but not all that glitters is glioma. *Neuro Oncol.* 2013;15(3):341-51.
31. Rapp M, Heinzl A, Galldiks N, Stoffels G, Felsberg J, Ewelt C, et al. Diagnostic performance of 18F-FET PET in newly diagnosed cerebral lesions suggestive of glioma. *J Nucl Med.* 2013;54(2):229-35.
32. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.
33. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer.* 1981;47(1):207-14.
34. Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, Jr., Cairncross JG. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol.* 1990;8(7):1277-80.
35. Kumar AJ, Leeds NE, Fuller GN, Van Tassel P, Maor MH, Sawaya RE, et al. Malignant gliomas: MR imaging spectrum of radiation therapy- and chemotherapy-induced necrosis of the brain after treatment. *Radiology.* 2000;217(2):377-84.
36. Finn MA, Blumenthal DT, Salzman KL, Jensen RL. Transient postictal MRI changes in patients with brain tumors may mimic disease progression. *Surg Neurol.* 2007;67(3):246-50; discussion 50.
37. Ulmer S, Braga TA, Barker FG, 2nd, Lev MH, Gonzalez RG, Henson JW. Clinical and radiographic features of peritumoral infarction following resection of glioblastoma. *Neurology.* 2006;67(9):1668-70.

38. Radbruch A, Fladt J, Kickingereeder P, Wiestler B, Nowosielski M, Baumer P, et al. Pseudoprogression in patients with glioblastoma: clinical relevance despite low incidence. *Neuro Oncol.* 2015;17(1):151-9.
39. de Wit MC, de Bruin HG, Eijkenboom W, Sillevs Smitt PA, van den Bent MJ. Immediate post-radiotherapy changes in malignant glioma can mimic tumor progression. *Neurology.* 2004;63(3):535-7.
40. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Blatt V, Pession A, Tallini G, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol.* 2008;26(13):2192-7.
41. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell.* 2007;11(1):83-95.
42. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, et al. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 2007;13(4):1253-9.
43. Hyare H, Thust S, Rees J. Advanced MRI Techniques in the Monitoring of Treatment of Gliomas. *Curr Treat Options Neurol.* 2017;19(3):11.
44. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol.* 2010;28(11):1963-72.
45. Okada H, Weller M, Huang R, Finocchiaro G, Gilbert MR, Wick W, et al. Immunotherapy response assessment in neuro-oncology: a report of the RANO working group. *Lancet Oncol.* 2015;16(15):e534-42.
46. Curran WJ, Jr., Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(9):704-10.
47. Mirmanoff RO, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* 2006;24(16):2563-9.
48. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(7):707-15.
49. Berghoff AS, Stefanits H, Woehrer A, Heinzl H, Preusser M, Hainfellner JA, et al. Clinical neuropathology practice guide 3-2013: levels of evidence and clinical utility of prognostic and predictive candidate brain tumor biomarkers. *Clin Neuropathol.* 2013;32(3):148-58.
50. Berghoff AS, Hainfellner JA, Marosi C, Preusser M. Assessing MGMT methylation status and its current impact on treatment in glioblastoma. *CNS Oncol.* 2015;4(1):47-52.
51. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* 2008;26(25):4189-99.
52. Thuy MN, Kam JK, Lee GC, Tao PL, Ling DQ, Cheng M, et al. A novel literature-based approach to identify genetic and molecular predictors of survival in glioblastoma multiforme: Analysis of 14,678 patients using systematic review and meta-analytical tools. *J Clin Neurosci.* 2015;22(5):785-99.
53. Roder C, Bisdas S, Ebner FH, Honegger J, Naegele T, Ernemann U, et al. Maximizing the extent of resection and survival benefit of patients in glioblastoma surgery: high-field iMRI versus conventional and 5-ALA-assisted surgery. *Eur J Surg Oncol.* 2014;40(3):297-304.
54. Saito T, Muragaki Y, Maruyama T, Tamura M, Nitta M, Okada Y. Intraoperative Functional Mapping and Monitoring during Glioma Surgery. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2015;55 Suppl 1:1-13.

55. Prada F, Bene MD, Fornaro R, Vetrano IG, Martegani A, Aiani L, et al. Identification of residual tumor with intraoperative contrast-enhanced ultrasound during glioblastoma resection. *Neurosurg Focus*. 2016;40(3):E7.
56. Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(11):997-1003.
57. Brzozowska A, Torun A, Mazurkiewicz M. The impact of surgery on the efficacy of adjuvant therapy in glioblastoma multiforme. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24(2):279-87.
58. Stummer W, Meinel T, Ewelt C, Martus P, Jakobs O, Felsberg J, et al. Prospective cohort study of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide chemotherapy for glioblastoma patients with no or minimal residual enhancing tumor load after surgery. *J Neurooncol*. 2012;108(1):89-97.
59. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, et al. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol*. 2008;9(1):29-38.
60. Laws ER, Parney IF, Huang W, Anderson F, Morris AM, Asher A, et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg*. 2003;99(3):467-73.
61. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*. 2001;95(2):190-8.
62. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*. 2008;62(3):564-76; discussion -76.
63. Teixidor P, Capellades J, Puig J, Doménech S, Balaña C, Goncalves FJ, Rimbau J. CO179 - Impacto de la cirugía en la supervivencia de una serie de pacientes intervenidos de glioblastoma multiforme (GLIOCAT) estratificados según la metilación de *MGMT*. *Neurocirugía*. 2017;28.
64. Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Jr., Batzdorf U, Brooks WH, et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med*. 1980;303(23):1323-9.
65. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G, Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol*. 2002;64(3):259-73.
66. Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer*. 1993;71(8):2585-97.
67. 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(9311):1011-8.
68. Athanassiou H, Synodinou M, Maragoudakis E, Paraskevaidis M, Verigos C, Misailidou D, et al. Randomized phase II study of temozolomide and radiotherapy compared with radiotherapy alone in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2005;23(10):2372-7.
69. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017;318(23):2306-16.
70. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated *MGMT* promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1100-8.

71. Chinot OL, de La Motte Rouge T, Moore N, Zeaiter A, Das A, Phillips H, et al. AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Adv Ther.* 2011;28(4):334-40.
72. Narita Y, Arakawa Y, Yamasaki F, Nishikawa R, Aoki T, Kanamori M, et al. A randomized, double-blind, phase III trial of personalized peptide vaccination for recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2018.
73. Brada M, Ashley S, Dowe A, Gonsalves A, Huchet A, Pesce G, et al. Neoadjuvant phase II multicentre study of new agents in patients with malignant glioma after minimal surgery. Report of a cohort of 187 patients treated with temozolomide. *Ann Oncol.* 2005;16(6):942-9.
74. Wick W, Hermisson M, Kortmann RD, Kuker WM, Duffner F, Dichgans J, et al. Neoadjuvant gemcitabine/treosulfan chemotherapy for newly diagnosed glioblastoma: a phase II study. *J Neurooncol.* 2002;59(2):151-5.
75. Balana C, Lopez-Pousa A, Berrocal A, Yaya-Tur R, Herrero A, Garcia JL, et al. Phase II study of temozolomide and cisplatin as primary treatment prior to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme patients with measurable disease. A study of the Spanish Medical Neuro-Oncology Group (GENOM). *J Neurooncol.* 2004;70(3):359-69.
76. Chinot OL, Barrie M, Fuentes S, Eudes N, Lancelot S, Metellus P, et al. Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J Clin Oncol.* 2007;25(12):1470-5.
77. Grossman SA, O'Neill A, Grunnet M, Mehta M, Pearlman JL, Wagner H, et al. Phase III study comparing three cycles of infusional carmustine and cisplatin followed by radiation therapy with radiation therapy and concurrent carmustine in patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma multiforme: Eastern Cooperative Oncology Group Trial 2394. *J Clin Oncol.* 2003;21(8):1485-91.
78. Chauffert B, Feuvret L, Bonnetain F, Taillandier L, Frappaz D, Taillia H, et al. Randomized phase II trial of irinotecan and bevacizumab as neo-adjuvant and adjuvant to temozolomide-based chemoradiation compared with temozolomide-chemoradiation for unresectable glioblastoma: final results of the TEMAVIR study from ANOCEF dagger. *Ann Oncol.* 2014;25(7):1442-7.
79. Hofland KF, Hansen S, Sorensen M, Engelholm S, Schultz HP, Muhic A, et al. Neoadjuvant bevacizumab and irinotecan versus bevacizumab and temozolomide followed by concomitant chemoradiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme: A randomized phase II study. *Acta Oncol.* 2014;53(7):939-44.
80. Balana C, De Las Penas R, Sepulveda JM, Gil-Gil MJ, Luque R, Gallego O, et al. Bevacizumab and temozolomide versus temozolomide alone as neoadjuvant treatment in unresected glioblastoma: the GENOM 009 randomized phase II trial. *J Neurooncol.* 2016;127(3):569-79.
81. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017;376(11):1027-37.
82. Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):916-26.
83. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* 2007;6(8):1079-99.
84. Xu-Welliver M, Pegg AE. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis.* 2002;23(5):823-30.
85. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4733-40.

86. Wick W, Puduvalli VK, Chamberlain MC, van den Bent MJ, Carpentier AF, Cher LM, et al. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2010;28(7):1168-74.
87. Mrugala MM, Crew LK, Fink JR, Spence AM. Carboplatin and bevacizumab for recurrent malignant glioma. *Oncol Lett.* 2012;4(5):1082-6.
88. van den Bent M, Gan HK, Lassman AB, Kumthekar P, Merrell R, Butowski N, et al. Efficacy of deparatuzumab mafodotin (ABT-414) monotherapy in patients with EGFR-amplified, recurrent glioblastoma: results from a multi-center, international study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;80(6):1209-17.
89. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455(7216):1061-8.
90. Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol.* 2012;124(5):615-25.
91. Chung R, Whaley J, Kley N, Anderson K, Louis D, Menon A, et al. TP53 gene mutations and 17p deletions in human astrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 1991;3(5):323-31.
92. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget.* 2012;3(7):709-22.
93. Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53(1):11-21.
94. Meyer-Puttlitz B, Hayashi Y, Waha A, Rollbrocker B, Bostrom J, Wiestler OD, et al. Molecular genetic analysis of giant cell glioblastomas. *Am J Pathol.* 1997;151(3):853-7.
95. Chakravarti A, Delaney MA, Noll E, Black PM, Loeffler JS, Muzikansky A, et al. Prognostic and pathologic significance of quantitative protein expression profiling in human gliomas. *Clin Cancer Res.* 2001;7(8):2387-95.
96. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol.* 2016;18(1):16-26.
97. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765-73.
98. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, et al. The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathol.* 2010;119(4):487-94.
99. <http://proteinaseestructurafuncion.usal.es/moleculas/IsocitratoDeshidrogenasas/index.html>.
100. Yang P, Zhang W, Wang Y, Peng X, Chen B, Qiu X, et al. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry. *Oncotarget.* 2015;6(38):40896-906.
101. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(16):1246-56.
102. Perry A, Aldape KD, George DH, Burger PC. Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer.* 2004;101(10):2318-26.
103. Benito R, Gil-Benso R, Quilis V, Perez M, Gregori-Romero M, Roldan P, et al. Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathology.* 2010;30(4):392-400.
104. Ghosh A, Saginc G, Leow SC, Khatrar E, Shin EM, Yan TD, et al. Telomerase directly regulates NF-kappaB-dependent transcription. *Nat Cell Biol.* 2012;14(12):1270-81.
105. Huse JT. TERT promoter mutation designates biologically aggressive primary glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2015;17(1):5-6.

106. Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M, et al. TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2015;17(1):45-52.
107. Mosrati MA, Malmstrom A, Lysiak M, Krysztofiak A, Hallbeck M, Milos P, et al. TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget.* 2015;6(18):16663-73.
108. Costello JF, Futscher BW, Tano K, Graunke DM, Pieper RO. Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *J Biol Chem.* 1994;269(25):17228-37.
109. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol.* 2010;6(1):39-51.
110. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell.* 2016;164(3):550-63.
111. Huse JT, Phillips HS, Brennan CW. Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. *Glia.* 2011;59(8):1190-9.
112. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):157-73.
113. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010;17(1):98-110.
114. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010;17(5):510-22.
115. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002;196(1):1-7.
116. Esteller M. The coming of age of DNA methylation in medicine in the genomics and postgenomics era. *Clin Immunol.* 2002;103(3 Pt 1):213-6.
117. Brenner C, Fuks F. DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;301:45-66.
118. Clark SJ, Harrison J, Frommer M. CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat Genet.* 1995;10(1):20-7.
119. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:629-56.
120. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002;21(35):5427-40.
121. Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(5):389-98.
122. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):484-92.
123. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet.* 1998;20(2):116-7.
124. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 1997;13(8):335-40.
125. Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet.* 2001;10(26):3001-7.

126. Fraga MF, Herranz M, Espada J, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, et al. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res.* 2004;64(16):5527-34.
127. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000;16(4):168-74.
128. Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol.* 2003;4(6):351-8.
129. Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet.* 1989;83(2):155-8.
130. Esteller M, Cordon-Cardo C, Corn PG, Meltzer SJ, Pohar KS, Watkins DN, et al. p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2. *Cancer Res.* 2001;61(7):2816-21.
131. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, et al. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* 1995;55(22):5195-9.
132. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene.* 1998;17(18):2413-7.
133. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997;57(5):808-11.
134. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1999;59(5):1090-5.
135. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(7):564-9.
136. Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, et al. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin Cancer Res.* 1996;2(5):805-10.
137. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1994;54(10):2552-5.
138. Jarrard DF, Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, Hoff D, Meisner LF, et al. Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58(23):5310-4.
139. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001;61(8):3225-9.
140. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* 2000;24(2):132-8.
141. Moran S, Martinez-Cardus A, Sayols S, Musulen E, Balana C, Estival-Gonzalez A, et al. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2016;17(10):1386-95.
142. Villar-Garea A, Esteller M. DNA demethylating agents and chromatin-remodelling drugs: which, how and why? *Curr Drug Metab.* 2003;4(1):11-31.
143. Malley DS, Hamoudi RA, Kocalkowski S, Pearson DM, Collins VP, Ichimura K. A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma cells and xenografts. *Acta Neuropathol.* 2011;121(5):651-61.

144. Citron M, Graver M, Schoenhaus M, Chen S, Decker R, Kleynerman L, et al. Detection of messenger RNA from O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene MGMT in human normal and tumor tissues. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(5):337-40.
145. Margison GP, Santibanez-Koref MF. O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenesis and chemotherapy. *Bioessays.* 2002;24(3):255-66.
146. Bartsch H, Montesano R. Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis.* 1984;5(11):1381-93.
147. DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res.* 2004;567(2-3):447-74.
148. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(4):296-307.
149. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000;343(19):1350-4.
150. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann 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(6):1871-4.
151. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003.
152. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res.* 2004;10(15):4933-8.
153. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol.* 2009;27(34):5743-50.
154. Weiler M, Hartmann C, Wiewrodt D, Herrlinger U, Gorlia T, Bahr O, et al. Chemoradiotherapy of newly diagnosed glioblastoma with intensified temozolomide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;77(3):670-6.
155. Balana C, Ramirez JL, Taron M, Roussos Y, Ariza A, Ballester R, et al. O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2003;9(4):1461-8.
156. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(7):372-85.
157. Silber JR, Blank A, Bobola MS, Mueller BA, Kolstoe DD, Ojemann GA, et al. Lack of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in histologically normal brain adjacent to primary human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(14):6941-6.
158. Zaidi NH, Liu L, Gerson SL. Quantitative immunohistochemical estimates of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase expression in normal and malignant human colon. *Clin Cancer Res.* 1996;2(3):577-84.
159. Mollemann M, Wolter M, Felsberg J, Collins VP, Reifenberger G. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer.* 2005;113(3):379-85.
160. Mikeska T, Candiloro IL, Dobrovic A. The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation. *Epigenomics.* 2010;2(4):561-73.
161. Pixberg CF, Schulz WA, Stoecklein NH, Neves RP. Characterization of DNA Methylation in Circulating Tumor Cells. *Genes (Basel).* 2015;6(4):1053-75.

162. Al Harrasi I, Al-Yahyai R, Yaish MW. Detection of Differential DNA Methylation Under Stress Conditions Using Bisulfite Sequence Analysis. *Methods Mol Biol.* 2017;1631:121-37.
163. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9821-6.
164. Cottrell SE, Laird PW. Sensitive detection of DNA methylation. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;983:120-30.
165. Shaw RJ, Akufo-Tetteh EK, Risk JM, Field JK, Liloglou T. Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(11):e78.
166. Hyman ED. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem.* 1988;174(2):423-36.
167. Melamede RJ, inventorAutomatable process for sequencing nucleotide patent US 4863849; Other: PPN: US 6-756129A United States Other: PPN: US 6-756129A Patent and Trademark Office, Box 9, Washington, DC 20232 NOV English. 1989.
168. Nyren P, Uhlen, M., Ronaghi, M., inventorMethod of sequencing DNA based on the detection of the release of pyrophosphate and enzymatic nucleotide degradation. Uppsala (SE)2001 Apr. 3, 2001.
169. Pantel K, Alix-Panabieres C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med.* 2010;16(9):398-406.
170. Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer.* 2017;16(1):80.
171. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
172. Redzic JS, Ung TH, Graner MW. Glioblastoma extracellular vesicles: reservoirs of potential biomarkers. *Pharmgenomics Pers Med.* 2014;7:65-77.
173. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014;32(6):579-86.
174. Huang TY, Piunti A, Lulla RR, Qi J, Horbinski CM, Tomita T, et al. Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5(1):28.
175. Chen J, Huan W, Zuo H, Zhao L, Huang C, Liu X, et al. Alu methylation serves as a biomarker for non-invasive diagnosis of glioma. *Oncotarget.* 2016;7(18):26099-106.
176. Weaver KD, Grossman SA, Herman JG. Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma. *Cancer Invest.* 2006;24(1):35-40.
177. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1987;23(6):707-12.
178. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37(3):646-50.
179. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869;14:146-9
180. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3213-21.
181. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol.* 2010;2010:617421.
182. Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol.* 2014;32(31):3483-9.
183. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):6302-9.

184. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(7):1420-30.
185. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol.* 2016;10(3):374-94.
186. Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B, Carter BS. Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(10):943-7.
187. Sullivan JP, Nahed BV, Madden MW, Oliveira SM, Springer S, Bhere D, et al. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discov.* 2014;4(11):1299-309.
188. Macarthur KM, Kao GD, Chandrasekaran S, Alonso-Basanta M, Chapman C, Lustig RA, et al. Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Res.* 2014;74(8):2152-9.
189. Lowes LE, Allan AL. Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells. *Cancers (Basel).* 2014;6(1):595-624.
190. Muller C, Holtschmidt J, Auer M, Heitzer E, Lamszus K, Schulte A, et al. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Sci Transl Med.* 2014;6(247):247ra101.
191. Gao F, Cui Y, Jiang H, Sui D, Wang Y, Jiang Z, et al. Circulating tumor cell is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system. *Oncotarget.* 2016;7(44):71330-40.
192. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-83.
193. Martins VR, Dias MS, Hainaut P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2013;25(1):66-75.
194. Shao H, Chung J, Balaj L, Charest A, Bigner DD, Carter BS, et al. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med.* 2012;18(12):1835-40.
195. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Estevés M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10(12):1470-6.
196. Chen WW, Balaj L, Liao LM, Samuels ML, Kotsopoulos SK, Maguire CA, et al. BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013;2:e109.
197. Noerholm M, Balaj L, Limperg T, Salehi A, Zhu LD, Hochberg FH, et al. RNA expression patterns in serum microvesicles from patients with glioblastoma multiforme and controls. *BMC Cancer.* 2012;12:22.
198. Manterola L, Guruceaga E, Gallego Perez-Larraya J, Gonzalez-Huarriz M, Jauregui P, Tejada S, et al. A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro Oncol.* 2014;16(4):520-7.
199. Manda SV, Kataria Y, Tatireddy BR, Ramakrishnan B, Ratnam BG, Lath R, et al. Exosomes as a biomarker platform for detecting epidermal growth factor receptor-positive high-grade gliomas. *J Neurosurg.* 2018;128(4):1091-101.
200. Figueroa JM, Skog J, Akers J, Li H, Komotar R, Jensen R, et al. Detection of wild-type EGFR amplification and EGFRVIII mutation in CSF-derived extracellular vesicles of glioblastoma patients. *Neuro Oncol.* 2017;19(11):1494-502.
201. Figueroa JM, Carter BS. Detection of glioblastoma in biofluids. *J Neurosurg.* 2018;129(2):334-40.
202. Jung CS, Foerch C, Schanzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, et al. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007;130(Pt 12):3336-41.
203. Tichy J, Spechtmeyer S, Mittelbronn M, Hattingen E, Rieger J, Senft C, et al. Prospective evaluation of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a diagnostic marker for glioblastoma. *J Neurooncol.* 2016;126(2):361-9.

204. Kiviniemi A, Gardberg M, Frantzen J, Parkkola R, Vuorinen V, Pesola M, et al. Serum levels of GFAP and EGFR in primary and recurrent high-grade gliomas: correlation to tumor volume, molecular markers, and progression-free survival. *J Neurooncol.* 2015;124(2):237-45.
205. Quaranta M, Divella R, Daniele A, Di Tardo S, Venneri MT, Lolli I, et al. Epidermal growth factor receptor serum levels and prognostic value in malignant gliomas. *Tumori.* 2007;93(3):275-80.
206. Hormigo A, Gu B, Karimi S, Riedel E, Panageas KS, Edgar MA, et al. YKL-40 and matrix metalloproteinase-9 as potential serum biomarkers for patients with high-grade gliomas. *Clin Cancer Res.* 2006;12(19):5698-704.
207. Szymas J, Morkowski S, Tokarz F. Determination of the glial fibrillary acidic protein in human cerebrospinal fluid and in cyst fluid of brain tumors. *Acta Neurochir (Wien).* 1986;83(3-4):144-50.
208. Nakagawa H, Yamada M, Kanayama T, Tsuruzono K, Miyawaki Y, Tokiyoshi K, et al. Myelin basic protein in the cerebrospinal fluid of patients with brain tumors. *Neurosurgery.* 1994;34(5):825-33; discussion 33.
209. Sampath P, Weaver CE, Sungarian A, Cortez S, Alderson L, Stopa EG. Cerebrospinal fluid (vascular endothelial growth factor) and serologic (recoverin) tumor markers for malignant glioma. *Cancer Control.* 2004;11(3):174-80.
210. Shen F, Zhang Y, Yao Y, Hua W, Zhang HS, Wu JS, et al. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid: toward the identification of biomarkers for gliomas. *Neurosurg Rev.* 2014;37(3):367-80; discussion 80.
211. Locasale JW, Melman T, Song S, Yang X, Swanson KD, Cantley LC, et al. Metabolomics of human cerebrospinal fluid identifies signatures of malignant glioma. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(6):M111 014688.
212. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA. *Cell.* 2013;153(3):516-9.
213. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(12):861-74.
214. Sole C, Arnaiz E, Manterola L, Otaegui D, Lawrie CH. The circulating transcriptome as a source of cancer liquid biopsy biomarkers. *Semin Cancer Biol.* 2019.
215. Teplyuk NM, Mollenhauer B, Gabriely G, Giese A, Kim E, Smolsky M, et al. MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. *Neuro Oncol.* 2012;14(6):689-700.
216. Drusco A, Bottoni A, Lagana A, Acunzo M, Fassan M, Cascione L, et al. A differentially expressed set of microRNAs in cerebro-spinal fluid (CSF) can diagnose CNS malignancies. *Oncotarget.* 2015;6(25):20829-39.
217. Dong L, Li Y, Han C, Wang X, She L, Zhang H. miRNA microarray reveals specific expression in the peripheral blood of glioblastoma patients. *Int J Oncol.* 2014;45(2):746-56.
218. Yue X, Lan F, Hu M, Pan Q, Wang Q, Wang J. Downregulation of serum microRNA-205 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma. *J Neurosurg.* 2016;124(1):122-8.
219. Lai NS, Wu DG, Fang XG, Lin YC, Chen SS, Li ZB, et al. Serum microRNA-210 as a potential noninvasive biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma. *Br J Cancer.* 2015;112(7):1241-6.
220. Mandel P MP. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142 241-3.
221. Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma or serum. *Clin Chim Acta.* 2001;313(1-2):143-6.
222. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.* 2001;313(1-2):139-42.
223. Lavon I, Refael M, Zelikovitch B, Shalom E, Siegal T. Serum DNA can define tumor-specific genetic and epigenetic markers in gliomas of various grades. *Neuro Oncol.* 2010;12(2):173-80.

224. Majchrzak-Celinska A, Paluszczak J, Kleszcz R, Magiera M, Barciszewska AM, Nowak S, et al. Detection of MGMT, RASSF1A, p15INK4B, and p14ARF promoter methylation in circulating tumor-derived DNA of central nervous system cancer patients. *J Appl Genet*. 2013;54(3):335-44.
225. Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):547-55.
226. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-90.
227. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(45):16368-73.
228. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA, Jr. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(18):1284-5.
229. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24.
230. Pan W, Gu W, Nagpal S, Gephart MH, Quake SR. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. *Clin Chem*. 2015;61(3):514-22.
231. Boisselier B, Gallego Perez-Larraya J, Rossetto M, Labussiere M, Ciccarino P, Marie Y, et al. Detection of IDH1 mutation in the plasma of patients with glioma. *Neurology*. 2012;79(16):1693-8.
232. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CK, Weigelt B, Martinez-Ricarte F, Torrejon D, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun*. 2015;6:8839.
233. Martinez-Ricarte F, Mayor R, Martinez-Saez E, Rubio-Perez C, Pineda E, Cordero E, et al. Molecular Diagnosis of Diffuse Gliomas through Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA from Cerebrospinal Fluid. *Clin Cancer Res*. 2018;24(12):2812-9.
234. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nature Reviews Genetics*. 2018.
235. Bienkowski M, Berghoff AS, Marosi C, Wohrer A, Heinzl H, Hainfellner JA, et al. Clinical Neuropathology practice guide 5-2015: MGMT methylation pyrosequencing in glioblastoma: unresolved issues and open questions. *Clin Neuropathol*. 2015;34(5):250-7.
236. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, et al. Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PLoS One*. 2012;7(3):e33449.
237. Havik AB, Brandal P, Honne H, Dahlback HS, Scheie D, Hektoen M, et al. MGMT promoter methylation in gliomas-assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *J Transl Med*. 2012;10:36.
238. Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hubner A, Ehrentraut D, Schramm J, et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn*. 2007;9(3):368-81.
239. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 1999;59(4):793-7.
240. Reimers N, Pantel K. Liquid biopsy: novel technologies and clinical applications. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(3):312-6.
241. Seoane J, De Mattos-Arruda L, Le Rhun E, Bardelli A, Weller M. Cerebrospinal fluid cell-free tumour DNA as a liquid biopsy for primary brain tumours and central nervous system metastases. *Ann Oncol*. 2018.

242. Wang Z, Jiang W, Wang Y, Guo Y, Cong Z, Du F, et al. MGMT promoter methylation in serum and cerebrospinal fluid as a tumor-specific biomarker of glioma. *Biomed Rep.* 2015;3(4):543-8.
243. Jacques G, Cormac O. Central nervous system tumors. *Handb Clin Neurol.* 2013;112:931-58.
244. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med.* 2017;9(403).
245. Vallee A, Marcq M, Bizieux A, Kouri CE, Lacroix H, Bennouna J, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer.* 2013;82(2):373-4.
246. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion.* 2001;41(2):276-82.
247. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1075:299-307.
248. Bonner ER, Bornhorst M, Packer RJ, Nazarian J. Liquid biopsy for pediatric central nervous system tumors. *NPJ Precis Oncol.* 2018;2:29.
249. Xue VW, Wong CSC, Cho WCS. Early detection and monitoring of cancer in liquid biopsy: advances and challenges. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019;1-4.
250. Li X, Ye M, Zhang W, Tan D, Jaffrezic-Renault N, Yang X, et al. Liquid biopsy of circulating tumor DNA and biosensor applications. *Biosens Bioelectron.* 2019;126:596-607.
251. van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, Wesseling P, Wurdinger T, de Vries HE. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat.* 2015;19:1-12.
252. Ramirez JL, Taron M, Balana C, Sarries C, Mendez P, de Aguirre I, et al. Serum DNA as a tool for cancer patient management. *Rocz Akad Med Bialymst.* 2003;48:34-41.
253. Balana C, Carrato C, Ramirez JL, Cardona AF, Berdiel M, Sanchez JJ, et al. Tumour and serum MGMT promoter methylation and protein expression in glioblastoma patients. *Clin Transl Oncol.* 2011;13(9):677-85.
254. Wojdacz TK. The limitations of locus specific methylation qualification and quantification in clinical material. *Front Genet.* 2012;3:21.
255. Philteos J, Karmur BS, Mansouri A. MGMT Testing in Glioblastomas: Pitfalls and Opportunities. *Am J Clin Oncol.* 2019;42(2):117-22.
256. Quillien V, Lavenu A, Sanson M, Legrain M, Dubus P, Karayan-Tapon L, et al. Outcome-based determination of optimal pyrosequencing assay for MGMT methylation detection in glioblastoma patients. *J Neurooncol.* 2014;116(3):487-96.
257. Mulholland S, Pearson DM, Hamoudi RA, Malley DS, Smith CM, Weaver JM, et al. MGMT CpG island is invariably methylated in adult astrocytic and oligodendroglial tumors with IDH1 or IDH2 mutations. *Int J Cancer.* 2012;131(5):1104-13.
258. Yoshioka M, Matsutani T, Hara A, Hirono S, Hiwasa T, Takiguchi M, et al. Real-time methylation-specific PCR for the evaluation of methylation status of MGMT gene in glioblastoma. *Oncotarget.* 2018;9(45):27728-35.
259. Reifenberger G, Hentschel B, Felsberg J, Schackert G, Simon M, Schnell O, et al. Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int J Cancer.* 2012;131(6):1342-50.
260. Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, Carpentier C, Labussiere M, Lesimple T, et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer.* 2012;118(17):4201-11.

261. Uno M, Oba-Shinjo SM, Camargo AA, Moura RP, Aguiar PH, Cabrera HN, et al. Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(10):1747-55.
262. Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, Wager M, Fromont G, Saikali S, et al. Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol*. 2010;97(3):311-22.
263. Collins VP, Ichimura K, Di Y, Pearson D, Chan R, Thompson LC, et al. Prognostic and predictive markers in recurrent high grade glioma; results from the BR12 randomised trial. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:68.
264. Preusser M, Berghoff AS, Manzl C, Filipits M, Weinhausel A, Pulverer W, et al. Clinical Neuropathology practice news 1-2014: pyrosequencing meets clinical and analytical performance criteria for routine testing of MGMT promoter methylation status in glioblastoma. *Clin Neuropathol*. 2014;33(1):6-14.
265. Johannessen LE, Brandal P, Myklebust TA, Heim S, Micci F, Panagopoulos I. MGMT Gene Promoter Methylation Status - Assessment of Two Pyrosequencing Kits and Three Methylation-specific PCR Methods for their Predictive Capacity in Glioblastomas. *Cancer Genomics Proteomics*. 2018;15(6):437-46.
266. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, et al. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer*. 2009;101(1):124-31.
267. Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, Criniere E, Busato F, Marie Y, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol*. 2009;11(4):348-56.
268. Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, et al. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer*. 2011;129(3):659-70.
269. Lattanzio L, Borgognone M, Mocellini C, Giordano F, Favata E, Fasano G, et al. MGMT promoter methylation and glioblastoma: a comparison of analytical methods and of tumor specimens. *Int J Biol Markers*. 2015;30(2):e208-16.
270. Xie H, Tubbs R, Yang B. Detection of MGMT promoter methylation in glioblastoma using pyrosequencing. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):636-42.
271. Rapkins RW, Wang F, Nguyen HN, Cloughesy TF, Lai A, Ha W, et al. The MGMT promoter SNP rs16906252 is a risk factor for MGMT methylation in glioblastoma and is predictive of response to temozolomide. *Neuro Oncol*. 2015;17(12):1589-98.
272. Jiang T, Mao Y, Ma W, Mao Q, You Y, Yang X, et al. CGCG clinical practice guidelines for the management of adult diffuse gliomas. *Cancer Lett*. 2016;375(2):263-73.
273. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem*. 2015;61(1):64-71.
274. Wick W, Gorlia T, Bady P, Platten M, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, et al. Phase II Study of Radiotherapy and Temozolomide versus Radiochemotherapy with Temozolomide in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma without MGMT Promoter Hypermethylation (EORTC 26082). *Clin Cancer Res*. 2016;22(19):4797-806.
275. Herrlinger U, Schafer N, Steinbach JP, Weyerbrock A, Hau P, Goldbrunner R, et al. Bevacizumab Plus Irinotecan Versus Temozolomide in Newly Diagnosed O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Nonmethylated Glioblastoma: The Randomized GLARIUS Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34(14):1611-9.
276. Zhao H, Wang S, Song C, Zha Y, Li L. The prognostic value of MGMT promoter status by pyrosequencing assay for glioblastoma patients' survival: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2016;14(1):261.

277. Brigladori G, Foca F, Dall'Agata M, Rengucci C, Melegari E, Cerasoli S, et al. Defining the cutoff value of MGMT gene promoter methylation and its predictive capacity in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2016;128(2):333-9.
278. Chai RC, Zhang KN, Liu YQ, Wu F, Zhao Z, Wang KY, et al. Combinations of four or more CpGs methylation present equivalent predictive value for MGMT expression and temozolomide therapeutic prognosis in gliomas. *CNS Neurosci Ther.* 2018.
279. Quillien V, Lavenu A, Ducray F, Joly MO, Chinot O, Fina F, 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):61916-29.
280. Chai RC, Liu YQ, Zhang KN, Wu F, Zhao Z, Wang KY, et al. A novel analytical model of MGMT methylation pyrosequencing offers improved predictive performance in patients with gliomas. *Mod Pathol.* 2019;32(1):4-15.
281. Villani V, Casini B, Pace A, Prosperini L, Carapella CM, Vidiri A, et al. The Prognostic Value of Pyrosequencing-Detected MGMT Promoter Hypermethylation in Newly Diagnosed Patients with Glioblastoma. *Dis Markers.* 2015;2015:604719.
282. Gurrieri L, De Carlo E, Gerratana L, De Maglio G, Macerelli M, Pisa FE, et al. MGMT pyrosequencing-based cut-off methylation level and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Future Oncol.* 2018;14(8):699-707.
283. De Carlo E, Gerratana L, De Maglio G, Buoro V, Cortiula F, Gurrieri L, et al. Defining a prognostic score based on O6-methylguanine-DNA methyltransferase cut-off methylation level determined by pyrosequencing in patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2018;140(3):559-68.
284. Sasai K, Nodagashira M, Nishihara H, Aoyanagi E, Wang L, Katoh M, et al. Careful exclusion of non-neoplastic brain components is required for an appropriate evaluation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioma: relationship between immunohistochemistry and methylation analysis. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(8):1220-7.
285. Nguyen A, Legrain M, Noel G, Coca A, Meyer Ea N, Schott R, et al. An Innovative Fluorescent Semi-quantitative Methylation-specific PCR Method for the Determination of MGMT Promoter Methylation is Reflecting Intra-tumor Heterogeneity. *Curr Cancer Drug Targets.* 2015;15(7):624-40.

11 ANEXOS

11.1 Anexo 1: Test neurocognitivo MMSE.

¿En qué año estamos? ¿En qué estación? ¿En qué día (fecha)? ¿En qué mes? ¿En qué día de la semana?	0-1 0-1 0-1 0-1 0-1	ORIENTACIÓN TEMPORAL (máximo 5)
¿En qué hospital (o lugar) estamos? ¿En qué piso (o planta, sala, servicio)? ¿En qué pueblo (ciudad)? ¿En qué provincia estamos? ¿En qué país (o nación, autonomía)?	0-1 0-1 0-1 0-1 0-1	ORIENTACIÓN ESPACIAL (máximo 5)
Nombre tres palabras peseta-caballo-manzana (o balón-bandera-árbol) a razón de 1 por segundo. Luego se pide al paciente que las repita. Esta primera repetición otorga la puntuación. Otorgue 1 punto por cada palabra correcta, pero continúe diciéndolas hasta que el sujeto repita las 3, hasta un máximo de 6 veces. Peseta 0-1 Caballo 0-1 Manzana 0-1 (Balón 0-1 Bandera 0-1 Árbol 0-1)		FIJACIÓN DE RECUERDO INMEDIATO (máximo 3)
Si tiene 30 euros y me los va dando de tres en tres, ¿Cuántos le van quedando? Detenga la prueba tras 5 sustracciones. Si el sujeto no puede realizar esta prueba, pídale que deletree la palabra MUNDO al revés 30 0-1, 27 0-1, 24 0-1, 21 0-1, 18 0-1 (O 0-1, D 0-1, N 0-1, U 0-1, M 0-1)		ATENCIÓN, CÁLCULO (máximo 5)
Preguntar por las tres palabras mencionadas anteriormente. Peseta 0-1 Caballo 0-1 Manzana 0-1 (Balón 0-1 Bandera 0-1 Árbol 0-1)		RECUERDO DIFERIDO (máximo 3)
DENOMINACIÓN. Mostrarle un lápiz o un bolígrafo y preguntar ¿qué es esto? Hacer lo mismo con un reloj de pulsera. Lápiz 0-1, reloj 0-1. REPETICIÓN. Pedirle que repita la frase: "ni sí, ni no, ni pero" (o "en un trigal había 5 perros") 0-1. ÓRDENES. Pedirle que siga la orden: "coja un papel con la mano derecha, dóblelo por la mitad, y póngalo en el suelo". Coge con la mano derecha 0-1, dobla por la mitad 0-1, pone en suelo 0-1. LECTURA. Escriba legiblemente en un papel "cierre los ojos". Pídale que lo lea y haga lo que dice la frase 0-1. ESCRITURA. Que escriba una frase (con sujeto y predicado) 0-1. COPIA. Dibuje 2 pentágonos intersecados y pida al sujeto que los copie tal cual. Para otorgar un punto deben estar presentes los 10 ángulos y la intersección 0-1		LENGUAJE (máximo 9)
Puntuaciones de referencia: ≥ 27: normal. ≤ 24: sospecha patológica. 12-24: deterioro. 9-12: demencia.		PUNTUACIÓN TOTAL (máximo 30)

11.2 Anexo 2: Índice de Barthel

Índice de Barthel		
Actividad	Descripción	Puntuación
Comer	Independiente. Capaz de comer por sí solo en un tiempo razonable. La comida puede ser cocinada y servida por otra persona.	10
	Necesita ayuda para cortar la carne, extender la mantequilla...etc., pero es capaz de comer solo.	5
	Dependiente. Necesita ser alimentado por otra persona.	0
Asearse personal	Independiente. Capaz de lavarse entero, de entrar y salir del baño sin ayuda y de hacerlo sin que una persona supervise.	5
	Dependiente. Necesita algún tipo de ayuda o supervisión.	0
Vestirse	Independiente. Capaz de ponerse y quitarse la ropa sin ayuda.	15
	Necesita ayuda. Realiza sin ayuda más de la mitad de estas tareas en un tiempo razonable.	10
	Dependiente. Necesita ayuda para las mismas.	5
Arreglarse	Independiente. Realiza todas las actividades personales sin ayuda alguna, los complementos necesarios pueden ser provistos por alguna persona.	0
	Dependiente. Necesita alguna ayuda.	15
Deponer	Continente. No presenta episodios de incontinencia.	10
	Accidente ocasional. Menos de una vez por semana o necesita ayuda para colocar enemas o supositorios.	5
	Incontinente. Más de un episodio semanal.	0
Miccionar	Continente. No presenta episodios. Capaz de utilizar cualquier dispositivo por sí solo (botella, sonda, orinal...).	10
	Accidente ocasional. Presenta un máximo de un episodio en 24 horas o requiere ayuda para la manipulación de sondas o de otros dispositivos.	5
	Incontinente. Más de un episodio en 24 horas.	0
Ir al baño	Independiente. Entra y sale solo y no necesita ayuda alguna por parte de otra persona.	10
	Necesita ayuda. Capaz de manejarse con una pequeña ayuda; es capaz de usar el cuarto de baño. Puede limpiarse solo.	5
	Dependiente. Incapaz de acceder a él o de utilizarlo sin ayuda mayor.	0
Trasladarse del sillón o cama	Independiente. No requiere ayuda para sentarse o levantarse de una silla ni para entrar o salir de la cama.	15
	Mínima ayuda. Incluye una supervisión o una pequeña ayuda física.	10
	Gran ayuda. Precisa ayuda de una persona fuerte o entrenada.	5
	Dependiente. Necesita una grúa o el alzamiento por dos personas. Es incapaz de permanecer sentado.	0
Deambular	Independiente. Puede andar 50 metros o su equivalente en casa sin ayuda supervisión. Puede utilizar cualquier ayuda mecánica excepto un andador. Si utiliza una prótesis, puede ponérsela y quitársela solo.	15
	Necesita ayuda. Necesita supervisión o una pequeña ayuda física por parte de otra persona o utiliza andador.	10
	Independiente en silla de ruedas. No requiere ayuda ni supervisión.	5
	Dependiente.	0
Subir escaleras	Independiente. Capaz de subir y bajar un piso sin ayuda ni supervisión de otra persona.	10
	Necesita ayuda. Necesita ayuda o supervisión.	5
	Dependiente. Es incapaz de salvar escalones.	0