



Universidad
Zaragoza



Valor pronóstico de la metilación del promotor MGMT en el Glioblastoma Multiforme

Prognostic value of MGMT promoter
methylation in Glioblastoma Multiforme

Trabajo de Fin de Grado
Junio de 2017

Director: Dr. Jesús Aguas
Alumna: Sara Chang Faria

Trabajo de Fin de Grado
Junio de 2017

Universidad de Zaragoza
Facultad de Medicina



**Valor pronóstico de la
metilación del promotor MGMT en
el Glioblastoma Multiforme**

***Prognostic value of
MGMT promoter methylation in
Glioblastoma Multiforme***

Director: Dr. Jesús Aguas (Neurocirugía)
Alumna: Sara Maria Chang Gamito de Faria

Índice

| | Pág. |
|--|-------------|
| 1. Resumen • <i>Abstract</i> | 2 |
| 2. Introducción | 4 |
| 2.1) Tipos de Gliomas | 4 |
| 2.2) El Glioblastoma Multiforme | 4 |
| 2.3) Clasificación del GBM | 5 |
| 2.4) Epidemiología | 9 |
| 2.5) Anatomía Patológica | 9 |
| 2.6) Presentación Clínica | 10 |
| 2.7) Diagnóstico | 10 |
| 2.8) Tratamiento | 11 |
| 2.9) Evolución y Pronóstico | 12 |
| 2.10) La metilación del promotor del gen MGMT y métodos de detección | 13 |
| 2.10.1) Detección de la metilación | 15 |
| 2.10.2) Estudios actuales | 17 |
| 3. Método | 18 |
| 3.1) Pacientes y Tratamiento | 18 |
| 3.2) Análisis del grado de metilación por Pirosecuenciación | 19 |
| 3.3) Análisis Estadístico | 19 |
| 4. Resultados | 20 |
| 4.1) Caracterización de la muestra | 20 |
| 4.2) Curvas de Supervivencia | 20 |
| 4.3) Comparación de los Chi-cuadrado | 22 |
| 4.4) Correlación entre el grado de metilación y los días de supervivencia | 22 |
| 5. Discusión | 24 |
| 6. Conclusión | 27 |
| 7. Bibliografía | 29 |
| 8. Anexos | 32 |

1. Resumen • *Abstract*

El Glioblastoma Multiforme (GBM) es el tumor cerebral más común en el adulto y el tipo de Astrocitoma más frecuente y de más alto grado. Posee un pronóstico realmente nefasto - aquellos pacientes sometidos a tratamiento sobreviven en media tan solo 14,6 meses y apenas el 30% llega a los 2 años.

Se ha enfatizado la importancia del estudio de la metilación del gen MGMT en el GBM. Su expresión se asocia a la resistencia tumoral a la terapia con agentes alquilantes, como la temozolamida. Por lo contrario, la metilación de dicho gen, es decir, la “silenciación” de su función, permite la actuación del agente terapéutico y se relaciona con una supervivencia más larga.

En este trabajo hemos analizado, a través de Pirosecuenciación, el estado de metilación MGMT en muestras tumorales de 47 individuos diagnosticados de GBM, obtenidas por biopsia o resección quirúrgica. El objetivo ha sido determinar de forma cuantitativa el valor pronóstico de la metilación del promotor del MGMT en el GBM. Para ello, se establecieron dos puntos de corte, pc25% y pc50%. En ambos, se observó un incremento de la supervivencia de los Metilados respecto a los No Metilados. Además, al año, de los Metilados, se encontraba vivo el 55,6% según el pc25, y el 71% según el pc50. Se ha verificado que el pc50 presenta una leve superioridad pronóstica respecto al pc25.

Palabras-clave: Glioblastoma Multiforme, Glioblastoma, metilación MGMT, temozolomida, punto de corte

Glioblastoma Multiform (GBM) is the most common brain tumor in adults and the highest-grade Astrocitoma type. It has a really poor prognosis – patients undergoing treatment have an average life expectancy of 14,6 months and only 30% reaches 2 years of survival from the moment they're diagnosed.

Several scientific studies have emphasized the value of MGMT gene methylation analysis on the GBM therapeutic approach. Its expression has been associated to tumor resistance to therapy with alkylating agents, such as temozolomide. On the contrary, the methylation status of MGMT gene, or in other words its “silencing”, translates on proper pharmacological therapeutic effect and, therefore, correlates to a better overall survival.

In this paper, we have analyzed, by Pyrosequencing, the MGMT methylation status of 47 patients from GBM diagnosed surgical resected tumor samples or biopsies. The main goal was to quantitatively determine the prognostic value of MGMT methylation in GBM. To this end, two cut-off points were established, co25% and co50%. In both of them, an increase in the survival of the Methylated compared to the Non-Methylated was observed. Moreover, one year after diagnosis, regarding the Methylated patients, 55,5% were alive according to co25, and 71% as well according to co50. We found that co50 has a slight prognostic superiority with respect to co25. M

Keywords: Glioblastoma Multiform, Glioblastoma, MGMT methylation, temozolomide, cut-off

2. Introducción

A lo largo de este apartado, nos enfocaremos en el Glioblastoma Multiforme y en los conocimientos actuales respecto al estado de metilación MGMT, contextualizándolos con más detalle.

2.1 Tipos de Gliomas

Los Gliomas (cerca de 45% de los tumores intracraneales) [5] se pueden clasificar en Astrocitomas, Oligodendrogliomas, Ependiomas, y Meningiomas. La etiología de los gliomas es multifactorial y tan sólo el 5% corresponde a gliomas malignos familiares y menos del 1% se asocian a síndromes genéticos conocidos (como el de Li-Fraumeni, de Turcot, y la Neurofibromatosis, por ejemplo). [1]

Una vez que son los más frecuentes, los Astrocitomas son uno de los tipos de tumores del SNC más estudiados y abordados. Ellos se clasifican de acuerdo con el grado de diferenciación y características de malignidad (atipia nuclear, número de mitosis, proliferación endotelial, y necrosis) en astrocitomas no infiltrantes - grado I, como los astrocitomas pilocíticos; los de crecimiento lento - grado II; los astrocitomas anaplásicos - grado III, que tienen una gran velocidad de crecimiento; y, por fin, los Glioblastomas - de IV grado, los más frecuentes (60-75% de los astrocitomas [4]) y conocidos por el pronóstico reservado que poseen. [5] El Glioblastoma Multiforme (GBM) presenta necesariamente proliferación microvascular prominente y/o áreas de necrosis. [1]

2.2 El Glioblastoma Multiforme

En este trabajo, nos enfocaremos en el Glioblastoma Multiforme (GBM) - un astrocitoma que, como su nombre indica, se origina de los astrocitos - células que forman parte del tejido de soporte del cerebro. Es el astrocitoma de crecimiento más rápido e invasivo y el tumor cerebral maligno más común. [4]

Como muchos otros tumores cerebrales, la causa es desconocida, atribuyéndose su aparición a la interacción de factores genéticos y ambientales.

Por la evolución nefasta que presentan [3], los Glioblastomas han sido, y lo siguen siendo, objeto de múltiples estudios retrospectivos y prospectivos. Hasta ahora, se han analizado, estudiado, y desarrollado, por ejemplo, varios planes terapéuticos para este tipo tumoral. Sin embargo, todavía sigue siendo imperativo un mayor conocimiento de todos los procesos fisiopatológicos, genéticos, y epigenéticos subyacentes a la evolución de esta enfermedad a fin de mejorar el diagnóstico y manejo clínico de los pacientes.

2.3 Clasificación del GBM

Los Glioblastomas se pueden clasificar de distintas formas. Las clasificaciones más frecuentes tienen en consideración aspectos clínicos y genéticos y, más recientemente, epigenéticos.

Por una parte, según la perspectiva **Clínica**, los podemos dividir en tumores primarios o secundarios, de acuerdo con la velocidad de crecimiento y datos epidemiológicos. En este sentido, los tumores primarios – GBM primarios o *de novo*, son los más frecuentes (60%), con mayor prevalencia en el sexo masculino, y se caracterizan por poseer una alta velocidad de replicación, desarrollándose en menos de 3 meses. Son pues muy agresivos. Diferentemente, los tumores secundarios (40%) habitualmente evolucionan desde un tumor de menor grado (como un astrocitoma de bajo grado o anaplásico, por ejemplo), en general se diagnostican en menores de 45 años, y tardan cerca de 4-5 años en formarse. Aunque el tiempo de evolución sea más largo, tienen sin embargo un carácter maligno. [3], [4]

La etiología del GBM, como ya hemos mencionado, es en gran parte desconocida. [4] No obstante, dichos tumores primarios y secundarios se distinguen también por la vía genética de desarrollo. Asimismo, estudios actuales los clasifican también según su expresión **Genética**. Es decir, de acuerdo con las células a partir de las cuales se originan - células madre, células amplificadoras, gliales, astrocitos, u oligodendrocitos – los clasificamos en distintos subtipos. [11]

Asimismo, los tumores primarios, se dividen en (Fig.1):

- GBM Clásicos: que presentan mutaciones, amplificaciones o sobreexpresión de los genes EGF, PTEN, CDKN2A, y NES. Suelen ser buenos respondedores a la radioterapia clásica y quimioterapia.
- GBM Mesenquimales o Angiogénicos: poseen mutaciones NF1, TP53, PTEN; sobreexpresión MET, CHI3L1, CD44, MERTK; y activación genética TNF y NFκB. Responden solamente a quimioterapia agresiva y se puede considerar la administración de inhibidores angiogénicos en el tratamiento.
- GBM Neurales: En ellos, el gen EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor – Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico) se encuentra mutado; y expresa marcadores neuronales – NEFL, GABRA1, SYT1, SCL12A5) . Es el que se encuentra, actualmente, peor definido. Su expresión genética se asemeja a la de las células normales del tejido cerebral. Presentan un bajo grado de infiltración y su expresión es sugestiva de un fenotipo relativamente diferenciado.
- GBM Proneurales: Comparten las alteraciones genéticas de los GBM secundarios (originados a partir un astrocitoma de grado II o III): alteraciones en los genes PDGFRA, IDH1, PIK3A/PIK31, TP53, CDKN2A y PTEN. Este subtipo posee un perfil de expresión remanente de la activación genética del desarrollo neuronal. Los pacientes suelen ser más jóvenes y se encuentra asociado a un mejor pronóstico. [11]

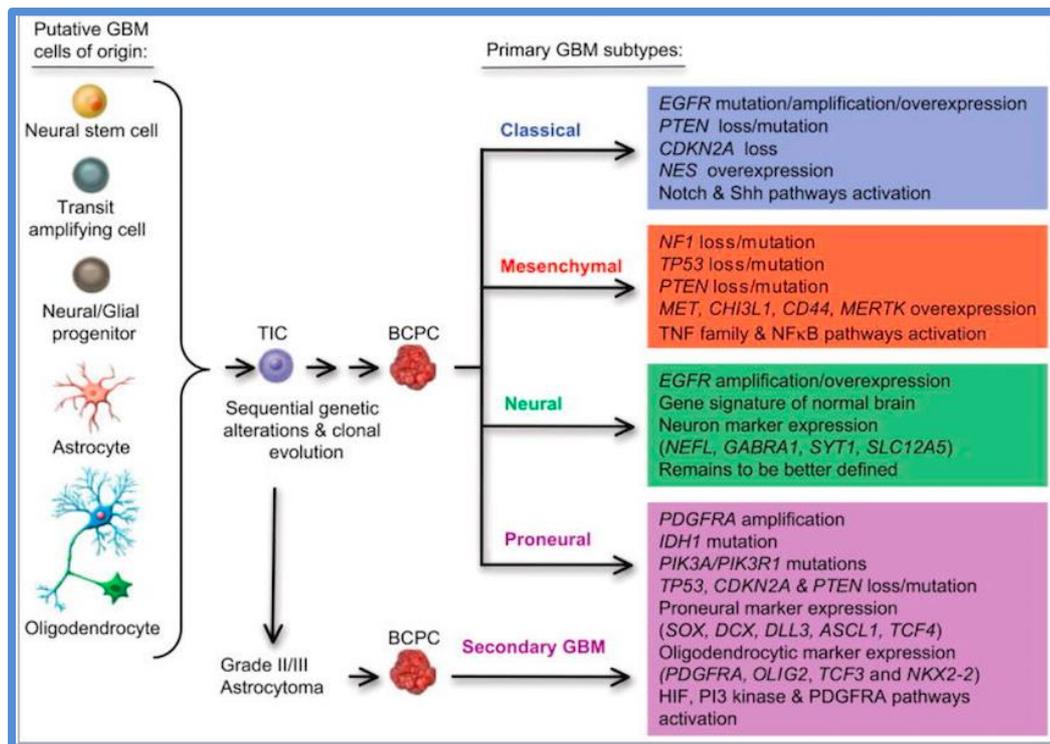


Fig. 1 - Esquema de los principales Subtipos de Glioblastomas identificados y patrón de alteraciones genéticas correspondiente. [11]

De hecho, se ha verificado que, de forma general, la clasificación genética se relaciona con la clasificación clínica – algunas alteraciones genéticas se asocian más a los tumores primarios, al paso que otras se asocian más a los secundarios. En este sentido, los *de novo*, presentan una alta tasa de sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, mutaciones PTEN (inducen una proliferación celular aberrante), deleciones en el gen p16INK4A, y alteraciones en el gen del retinoblastoma. En contraste, los GB secundarios pueden poseer pérdida de heterocigosidad en el brazo del 19q, inactivación del P53, alteraciones en las proteínas ribosomales, mutaciones PTEN, pérdida de expresión del gen DCC, y amplificación del gen mitogénico PDGF-alfa. Existen todavía otras mutaciones comunes a los dos tipos mencionados, específicas del GBM, como la pérdida de heterozigosidad del cromosoma 10q, que ocurre en cerca de 60-90% de los GBM y dicta un peor pronóstico. [1] , [3], [12]

Por otra parte, la **Epigenética** permite un diferente enfoque en la clasificación de este tipo de tumor. Asimismo, los estudios más recientes

clasifican el GBM según la metilación, o su ausencia, del promotor del gen MGMT – mMGMT o no mMGMT, respectivamente.

La enzima codificada por el gen MGMT (localizado en el cromosoma 10q26), la O-metilguanina-ADN metiltransferasa posee una función reparadora del ADN, transfiriendo grupos alquil de la posición O de la guanina – un sitio importante en la alquilación del ADN - e impidiendo la formación de enlaces en el material genético, que llevarían a la apoptosis y, consecuentemente a la deseada muerte celular tumoral. Es decir, dicha enzima inhibe la apoptosis inducida por los agentes alquilantes terapéuticos y “repara” el DNA tumoral ante diferentes lesiones. [6], [7]

La metilación de un determinado gen implica su “silenciación”, o sea, la no expresión de su información. El estado de metilación de un gen es pues un indicador de su actividad transcripcional y refleja, por consiguiente, la presencia o ausencia de la proteína (una enzima, por ejemplo) que expresa. En este sentido, la silenciación del gen MGMT a través de la metilación de su promotor se asocia a la pérdida de la expresión de dicho gen y a una disminución de la actividad reparadora del ADN.

Por ello, la expresión del gen MGMT se vincula a una mayor resistencia a la terapia con agentes alquilantes, moléculas extremadamente reactivas que causan muerte celular al unirse al DNA, generalmente en la mencionada posición O de la guanina. Por lo contrario, su metilación, o sea, la ausencia de su función, permite a que estos agentes terapéuticos actúen de forma más efectiva y benéfica. [6]

Entonces, la determinación del estado de metilación del promotor del gen MGMT, posibilita la selección de aquellos pacientes que tendrán una mayor probabilidad en beneficiar del tratamiento con agentes alquilantes, como la temozolamida, y, por consiguiente, un pronóstico más favorable reflejando una mejor supervivencia. Aquellos que se clasifican de no mMGMT, corresponden a un fenotipo resistente a la terapia y ello constituye un predictor pronóstico negativo. De hecho, este hallazgo es ya internacionalmente aceptado como un factor predictor de gran relieve de la respuesta a la terapia.

Un actual punto de interés e investigación es la variabilidad en la respuesta positiva a la terapia, y la hipótesis de que se pueda correlacionar con el grado de metilación de este gen.

2.4 Epidemiología

El GBM tiene un pico de incidencia alrededor de los 50 (45-70) años de edad, superior en el sexo masculino (H:M - 3:2). [3] A nivel mundial, la incidencia es de 2-3/100.000 casos por año, la prevalencia de 3,5/100.000, y representa el 15,4% de los tumores cerebrales primarios y cerca de 60-75% de los astrocitomas.

Es más frecuentemente diagnosticado en caucasianos o asiáticos, y en menor proporción en afroamericanos. Países como EEUU, Escandinavia, Israel, y otros en Asia, son lugares con una gran prevalencia de este tipo tumoral. [3] Sólo el 3% de tumores cerebrales en niños corresponde al Glioblastoma.

No se conocen factores de riesgo comprobados, pero se destaca la exposición a la radiación como un potencial agente exógeno.

2.5 Anatomía Patológica

El GBM se localiza en la zona blanca subcortical, más frecuentemente en el lobo Temporal y Frontal. Suele ser intraparenquimal con epicentro en la sustancia gris. [3] Una vez que se origina de células del tejido cerebral, es expectable que lo invada y siga creciendo en él. Sin embargo, raramente se encuentran metástasis a distancia.

Microscópicamente, es muy heterogéneo y está compuesto por varias células, algunas pleomórficas (Fig.2), por minerales, depósitos de calcio y vasos sanguíneos. Frecuentemente se denotan atipia nuclear e incremento de la actividad mitótica; crecimiento microvascular; áreas de necrosis; y proliferación endotelial.

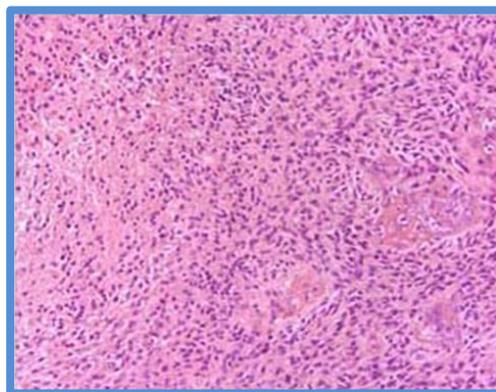


Fig. 2 - Microscopio Electrónico, tinción con HE: Glioblastoma Multiforme [1]

Macroscópicamente, son mal delimitados, con células gris periféricas y células amarillas provenientes de necrosis de la vaina de mielina. Se encuentran, a menudo, áreas de hemorragia reciente. [1]

Uno de los marcadores biológicos que se pueden encontrar en estos tumores es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), localizada en los astrocitos neoplásicos y, aunque el GBM evolucione hacia la desdiferenciación, muchas células siguen inmunopositivas para la GFAP, incluso en aquellos glioblastomas más agresivos. [1]

2.6 Presentación Clínica

Los pacientes que se presentan a la consulta suelen tener un cuadro evolutivo inferior a 3 meses. La presentación clínica se asemeja a la de otros tumores del SNC – señales del incremento de la presión intracraneal (PIC), como cefaleas que pueden estar presentes al despertar, náuseas, y vómitos; convulsiones (20% en la zona supratentorial); y sintomatología según el área del cerebro comprometida. [4] Son ejemplos de señales focales la hemiparesia, el déficit sensorial, la disminución de la agudeza visual, la afasia, etc. [3]

También hay pacientes que desarrollan un déficit neurológico progresivo, con debilidad motora, por ejemplo. [1]

2.7 Diagnóstico

El diagnóstico se realiza a través de la clínica, complementada modestamente por análisis de sangre (para excluir causas metabólicas y infecciosas); sustentada por métodos imagiológicos como la TAC y RMN; por el EEG; y, por supuesto, por la biopsia en el momento de la Cirugía. [1], [3]

La TAC tiene una menor sensibilidad para tumores de pequeñas dimensiones, pero permite denotar áreas hipointensas o hiperintensas y posibilita la visualización de edema. [2], [1]

A su vez, la RMN con contraste (gadolinio) (Fig.3) es mucho más sensible para la presencia tumoral y para sus hallazgos asociados (por ejemplo, el edema peritumoral ya mencionado). Es, actualmente, el gold-standard imagiológico. La

presencia de edema superior a 1 cm ha sido relatada como factor pronóstico negativo. [2], [10],

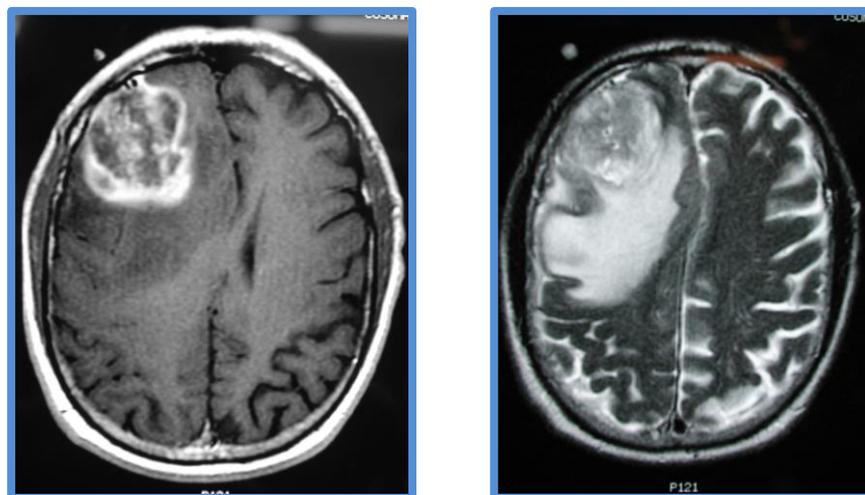


Fig. 3 - Izquierda: RMN en T1, denotando el tumor en el lobo frontal. Derecha: La misma imagen en T2, donde se puede apreciar edema y desvío de la línea media [1]

Después de la cirugía, diferenciar entre la recurrencia tumoral y la cicatriz postoperatoria puede ser difícil solo gracias a la RMN. Para este propósito, se suele emplear la PET. [2]

La Radiografía no presenta utilidad en la evaluación del tumor primario. Sin embargo, sí que puede jugar un rol en el estudio de la invasión tumoral craneal, demostrando erosión del hueso; o de metástasis a distancia, lo que sin embargo es raro, tal como mencionado previamente. [2]

2.8 Tratamiento

El manejo terapéutico del GBM está formado por distintas valencias. Generalmente, se asocian esquemas de Radio (RT) y Quimioterapia (QT) concomitante y después (adyuvante) de la resección quirúrgica. La resección es, de hecho, una parte bastante importante del tratamiento. [4]

Los esquemas de RT y QT varían, respectivamente, según la intensidad y dosis empleada (cerca de 2Gy en 5 días semanales durante 6 semanas, cumpliendo un total de 60Gy), y fármacos elegidos. [1],[15]

El fármaco quimioterapéutico de elección es la Temozolamida (TMZ, nombre comercial Temodal® o Temodar®), un agente alquilante, que se administra durante 6 semanas a 14 meses. Aproximadamente el 35% atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE). La supervivencia asociada a la TMZ es superior en aquellos pacientes con la metilación de promotor del gen MGMT (ver 2.3 y 2.10), y también se constató un mejor pronóstico en aquellos pacientes tratados con temozolomida y radioterapia, respecto a los que han recibido solamente radioterapia. [1],[15]

Más del 25% beneficia clínicamente con este tratamiento. Igualmente se pueden hacer esquemas de Cisplatino, o Erlotinib, por ejemplo.

De momento existen otras terapias, como la eléctrica de baja intensidad y frecuencia intermedia “Optuno”, que han logrado demostrar algún impacto benéfico. [1]

Además, el alivio sintomático debe también de ser proporcionado. Asimismo, se puede administrar Levetiracetam o Fenitoína para las convulsiones; y Dexametasona u otro corticoesteroide para el edema vasogénico, por ejemplo. [1]

2.9 Evolución y Pronóstico

Los Glioblastomas no suelen metastizar fuera del cerebro ya que no suelen invadir la región subaracnoidea, pero casi el 100% recurre en 6 - 7 meses. A nivel local, puede metastizar en el cuerpo calloso, cápsula interna, radiación óptica, comisura anterior, fórnix, y regiones subependimales. [1]

Sin tratamiento, la evolución natural del GBM condiciona solamente entre uno a cinco meses de supervivencia, la resección quirúrgica combinada con la radioterapia 3 meses más, y la administración de temozolamida añade unos cinco meses más.

Según Stupp et al, los pacientes sometidos al esquema terapéutico “Quimioterapia + Radioterapia + Resección quirúrgica”, presentan una supervivencia media de 12-14,6 meses y sólo el 25-30% sobrevive 2 años tras el diagnóstico. Se ha constatado que la quimioterapia adyuvante y concomitante a la administración de radiación se correlaciona con una progresión libre de

enfermedad (PLE) superior a la terapéutica exclusiva con radioterapia (6,9 meses vs 5 meses, respectivamente), bien como una mejor la supervivencia total (14,6 vs 12,1 meses). [1]

Menos del 10% vivirá hasta los 5 años siguientes. [3], [4] Sin embargo, existe un subgrupo de pacientes con GBM, correspondiente a 1-5% de los casos, que sobrevive por lo menos 3 años tras el diagnóstico – los designados de “Long Term Glioblastoma Survivors” (LTGS). En dichos pacientes ocurre frecuentemente (78,5%) la metilación del promotor de MGMT intratumoral. [10]

Además del estado de metilación mencionado, se consideran factores determinantes de pronóstico el grado histológico, la extensión de la resección quirúrgica, la presencia de edema, la edad en el momento del diagnóstico, y la escala funcional de Karnofsky - KPS (Karnofsky Performance Status) – que evalúa la capacidad del paciente en la realización de tareas cotidianas. [1], [10]

En este sentido, se sabe que el 50% de los pacientes con GBM de edad inferior a 40 años tienen una supervivencia de 18 meses; mientras de los que poseen entre 40 a 60 años, únicamente el 20% vivirá 18 meses. [1] De igual manera, se ha estudiado y verificado que la supervivencia disminuye con puntuaciones inferiores del KPS. Asimismo, 34% de aquellos pacientes con un resultado de 70 puntos llegan a los 18 meses; al paso que de los que presentan una valor inferior de dicha puntuación, sobreviven tan solo el 13% respecto a la misma expectativa de tiempo. [1]

2.10 La metilación del promotor del gen MGMT y métodos de detección

Esteller *et al* ha asociado la metilación del promotor MGMT a la regresión del tumor y a una mayor supervivencia libre de enfermedad, tratándose de un factor pronóstico fuerte e independiente de la edad, estadio tumoral, o estado de rendimiento en las ABVDs. [6] En 2005, Hegi *et al* también ha denotado la ventaja de la metilación del promotor del gen MGMT respecto al resultado obtenido ante la terapia con temozolomida. Este grupo de investigadores ha concluido que aquellos pacientes que presentaban dicha metilación (44,7% de los tumores analizados), es decir, la silenciación del gen, poseían un mejor pronóstico y respuesta al tratamiento. (Fig. 4). La media de expectativa de vida en el grupo

mencionado era de 18,2 meses – 6 meses más que los que no presentaban dicha metilación. [7]

Sabemos que el enlace entre la citosina y el grupo metil (CH₃ -) impide la expresión del gen asociado (Fig.5). A su vez, el MGMT regula la apoptosis celular y, por lo tanto, el crecimiento tumoral. Es decir, dicho gen confiere una ventaja tumoral por el carácter de resistencia que aporta. Asimismo, revierte la apoptosis mediada por el agente alquilante que había sido administrado con intención terapéutica. El hecho de su promotor estar metilado - en la zona de la citosina - y, por consiguiente, no se poder expresar, supone la ausencia de la función antagonista respecto al agente terapéutico, posibilita la actuación del fármaco y, por lo tanto, la apoptosis de las células tumorales.

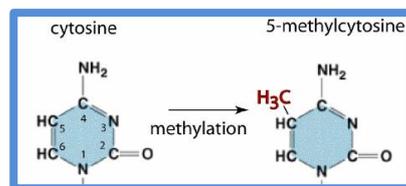


Fig. 4 – Metilación de la citosina a 5-metilcitosina

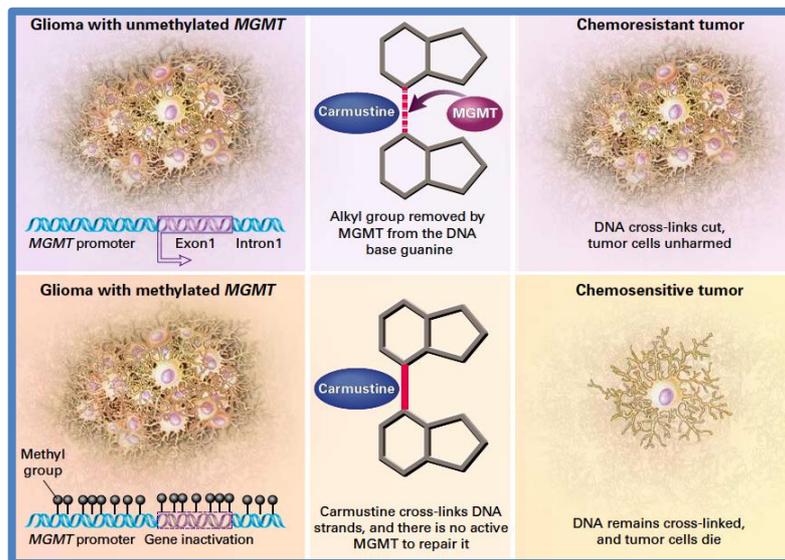


Fig. 5 – Mecanismo de sensibilidad a la quimioterapia resultante de la inactivación epigenética del gen reparador tumoral MGMT. Carmustina – una gente alquilante. [6]

➤ 2.10.1 Detección de la metilación

Para determinar si el MGMT se encuentra o no metilado existen varias técnicas que se pueden elegir. En este sentido, este análisis se puede lograr de forma cuantitativa (porcentaje de ADN metilado) o cualitativa (presencia o ausencia de la metilación).

En este estudio se ha utilizado la Pirosecuenciación (PSQ), un método que permite analizar de forma cuantitativa el porcentaje de metilación. La PSQ consiste en secuenciar el ADN en tiempo real, basándonos en la liberación de pirofosfatos en la reacción de polimerización del ADN a partir de sus nucleótidos (dNTPS). Al transcurrir la reacción, se va sintetizando una cadena complementaria y obteniendo una serie de picos de señal en el Pirograma que nos permitirá determinar la secuencia. Picos de mayor altura indican que se ha incorporado en mismo nucleótido varias veces, es decir, que en la cadena de ADN de estudio, dicho nucleótido se encuentra repetido varias veces de manera seguida (-CCCC- por ejemplo). Esta técnica se realiza tras el tratamiento de la muestra con Bisulfito (*Método 3.2*). El bisulfito hace que la Citosina se transforme en Uracilo y, posteriormente, sea detectado como Timina. Las bases que se encuentren metiladas en el localización de la Citosina, no se cambiarán y se detectarán como Citosina. Esto se interpretará en el Pirograma, y el porcentaje de metilación de una determinada muestra va a corresponder a una media de los porcentajes de los varios sitios del promotor estudiados.

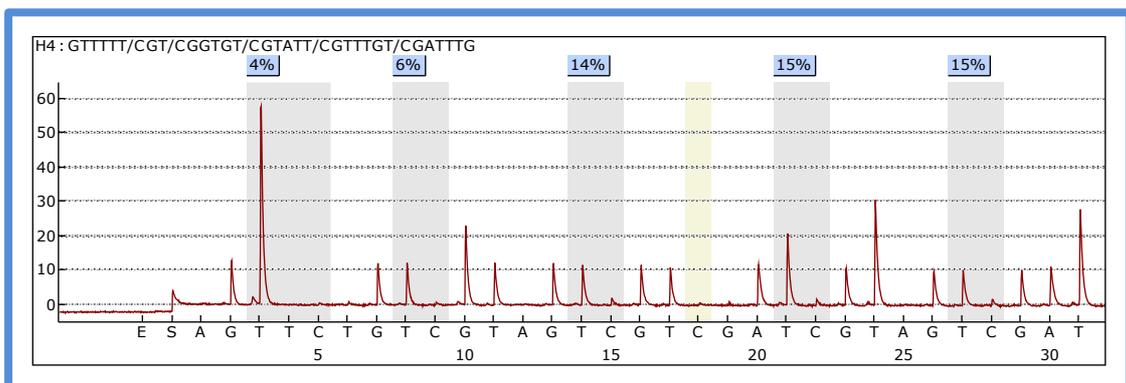


Fig. 6 – Ejemplo de un Pirograma. El porcentaje de metilación de esta muestra sería de 10,8%.

Christians *et al* ha evaluado las técnicas MSP (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction), PCR específica de metilación, como método cualitativo y semi-cuantitativo; PSQ como cuantitativo; y la MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification), es decir, Amplificación de Sondas Dependiente de Ligandos Múltiples, como método semi-cuantitativo. [8] Entonces, ha concluido que a diferencia del MS-MLPA, los métodos MSP (considerado durante mucho años el patrón-oro) y PSQ ofrecen una mejor predicción del PLE respecto a otros factores pronósticos clínicos. La PSQ, permite la cuantificación de la metilación de cada isla de dinucleótidos CpG y, por lo tanto, la detección de patrones heterogéneos de metilación (el gen del promotor posee varias islas). Curiosamente, algunas de estas muestras de metilación heterogéneas, han sido dadas como no metiladas al ser analizadas por MSP. [9] Asimismo, considerando el valor pronóstico, la rentabilidad y la facilidad de uso, recomiendan PSQ para el análisis del promotor MGMT en estudios de alto rendimiento, como el análisis de muestras de grandes ensayos clínicos; al paso que la MSP parece el método más conveniente en el diagnóstico de rutina con un número de muestras reducido. [8]

A continuación, se mencionan algunos aspectos característicos de la PSQ.

PSQ

- ✓ Información cuantitativa respecto a la extensión de la metilación. Analiza cada isla CpG con gran sensibilidad y especificidad.
- ✓ El mejor método de análisis de MGMT. Valor pronóstico bastante fidedigno.
- ✓ Quillien *et al* recomienda el análisis de 5CpGs (74-78) a fin de analizar el estado de metilación MGMT por PSQ, una vez que hay un kit comercial disponible que ya ha sido utilizado en varios estudios y que permite, asimismo, la comparación de resultados entre distintos laboratorios. [9]
- ✗ Interpretación de los resultados limitada por la falta de consenso respecto la importancia biológica del límite a partir del cual se los convierten en información binaria (Metilado o No metilado).
- ✗ Alto coste, por lo que no se suele usar en el diagnóstico de rutina. [8]

➤ 2.10.2 Estudios actuales

Actualmente existen varios aspectos relacionados con el análisis de la metilación MGMT que todavía no se conocen completamente y que son objeto de múltiples estudios.

En primer lugar, sabemos que el gen MGMT posee 5 exones y una “isla” rica en CpG con 762 pares de bases. Todavía sigue como cuestión abierta cuál o cuantos CpG en la isla del promotor de MGMT tienen un mejor impacto en la expresión del gen y mejor reflejan la respuesta al tratamiento y la supervivencia. [8]

En segundo lugar, otra cuestión importante es la determinación, en aquellas técnicas cuantitativas como la PSQ, de un punto de corte para dicotomizar los pacientes como metilados (M) o no metilados (U). El mejor predictor positivo de supervivencia total (ST) fue observado con el cut-off de 9% - los pacientes que resultaban, al realizar la PSQ, tener un porcentaje medio de metilación superior a 9%, tenían 26,2 meses de supervivencia total, y los que lo tenían metilado debajo de dicho punto de corte, tan sólo 15,8 meses de supervivencia total. Dichos datos se refieren al CpG 74-78. [9]

En tercer y último, en un estudio prospectivo, Kreth et al ha identificado la expresión MGMT en el mRNA como un predictor clínico de pronóstico independiente de la metilación del promotor MGMT, denotando quizás la no necesidad de analizar su promotor. Este puede ser un punto clave en el futuro de la detección del estado de metilación MGMT y, consecuentemente, del pronóstico del paciente con GBM. [8]

3. Método

3.1 Pacientes y Tratamiento

En este estudio, hemos seguido a un grupo de 47 pacientes diagnosticados de Glioblastoma Multiforme a lo largo de 8 años - de 2009 a 2017, en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB), Zaragoza. Los pacientes tenían entre 34 y 85 años, y una edad media de 62 años. En la Tabla 1. se reúnen las características de dichos pacientes y el estado de metilación hallado. El protocolo terapéutico inicial seguido ha sido el de Stupp et al. [15], adaptándose posteriormente la terapia a la respuesta individual de cada paciente. Por último, el resultado de la resección (completa o parcial) se determinó mediante RMN en el plazo inferior a 5 días después de la intervención quirúrgica.

| Características del Grupo Estudiado | | |
|-------------------------------------|------|-----|
| Edad | | |
| Mínima | | 34 |
| Máxima | | 85 |
| Media | | 62 |
| Mediana | | 61 |
| TR | | |
| Completa | | 34% |
| Subtotal | | 23% |
| Biopsia | | 43% |
| GM MGMT | | |
| pc 25 | <25% | 20 |
| | ≥25% | 27 |
| pc 50 | <50% | 30 |
| | ≥50% | 17 |

Tabla 1. - Características del grupo de pacientes estudiado. La **edad** mediana es de 61 años. **TR** - Tipos de Resección: el 34% (16 pacientes) ha obtenido una resección completa, 23% (11 pacientes) una subtotal, y el 43% (20 pacientes) ha realizado solamente la biopsia. El número total de pacientes corresponde a n=47. **GM MGMT** - Grado de Metilación del promotor MGMT. Se presenta el número de

pacientes que poseen un grado de metilación superior o inferior respecto a un determinado punto de corte (pc).

3.2 Análisis del grado de metilación por Pirosecuenciación

A fin de analizar el estado de metilación del promotor MGMT de cada paciente, se han recogido, en primer lugar, muestras tumorales en el momento de la resección quirúrgica y, en algunos pacientes, se ha realizado solamente la biopsia. (Tabla 1.). Las 47 muestras estudiadas e incluidas en el análisis estadístico corresponden a las muestras tumorales efectivamente viables (n=47). Sin embargo, en 8 pacientes (n_{inicial} = 55) no se ha logrado obtener ADN viable, por lo que han sido excluidas del estudio.

En segundo, las muestras han sido conservadas y almacenadas en bloques de parafina. Posteriormente, se ha extraído y cuantificado el DNA.

En tercer lugar, se ha procedido a la reacción de conversión con Bisulfito, separando las dos hebras de DNA. La incubación con bisulfito sódico ha durado entre 15 a 20h.

En cuarto, se ha realizado la reacción de PCR con cebadores bionitilados y, en quinto, comprobada la amplificación por electroforesis.

En sexto, tuvo lugar la Pirosecuenciación, y la posterior elaboración del informe con la media del porcentaje de metilación de cada muestra individual.

El análisis explicitado se ha llevado a cabo en el Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud de la Universidad de Zaragoza (IACS-UZ), ubicado en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

3.3 Análisis Estadístico

Los resultados han sido estimados por el método de análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, y el Chi-cuadrado calculado con el algoritmo Log Rank test. La correlación ha sido obtenida por el método de Pearson. El nivel de significancia para rechazar la hipótesis nula se ha fijado en $(\alpha) \leq 0,05$. Este análisis estadístico ha sido efectuado con el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versión 24.0 para el Windows.

De este modo, la supervivencia total ha sido calculada para los dos puntos de corte - 25% y 50% de metilación.

4. Resultados

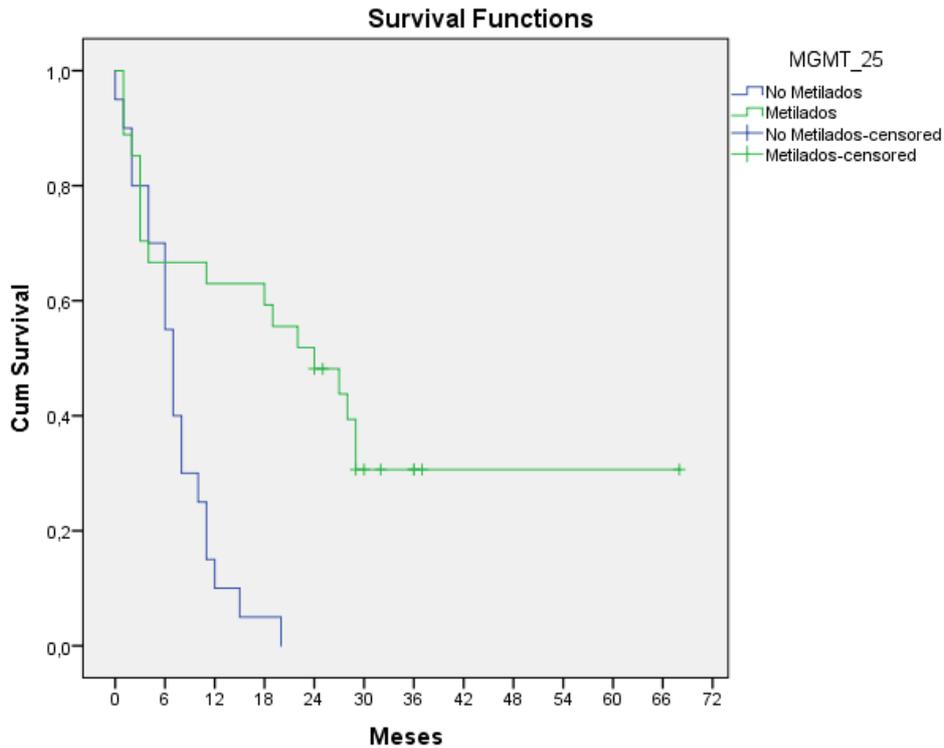
4.1 Caracterización de la muestra

En primer lugar, hemos caracterizado la muestra concluyendo que la media del porcentaje de metilación del promotor MGMT ha sido de **35,92%**, con un valor mínimo de 3,6 % y un valor máximo de 89,6%. Respecto a cada punto de corte (pc), 57,4% de la muestra superaba el pc25, mientras sólo el 36,2% superaba el pc50. (*Tabla 1 y 2 de Anexos*)

Del mismo modo, la media de supervivencia, en días, ha sido de 441,36 con un desvío-patrón de 419,417. Es decir, una media de supervivencia de 14,7 meses, considerando un mes de 30 días. El valor mínimo de supervivencia ha sido de 9 días y el máximo de 2033 días. Hemos verificado que, a la fecha de conclusión de este trabajo, 38 pacientes (80,9%) había ya fallecido y tan solo 9 (19,1%) se encontraban vivos. (*Tabla 1 y 2 de Anexos*)

4.2 Curvas de supervivencia

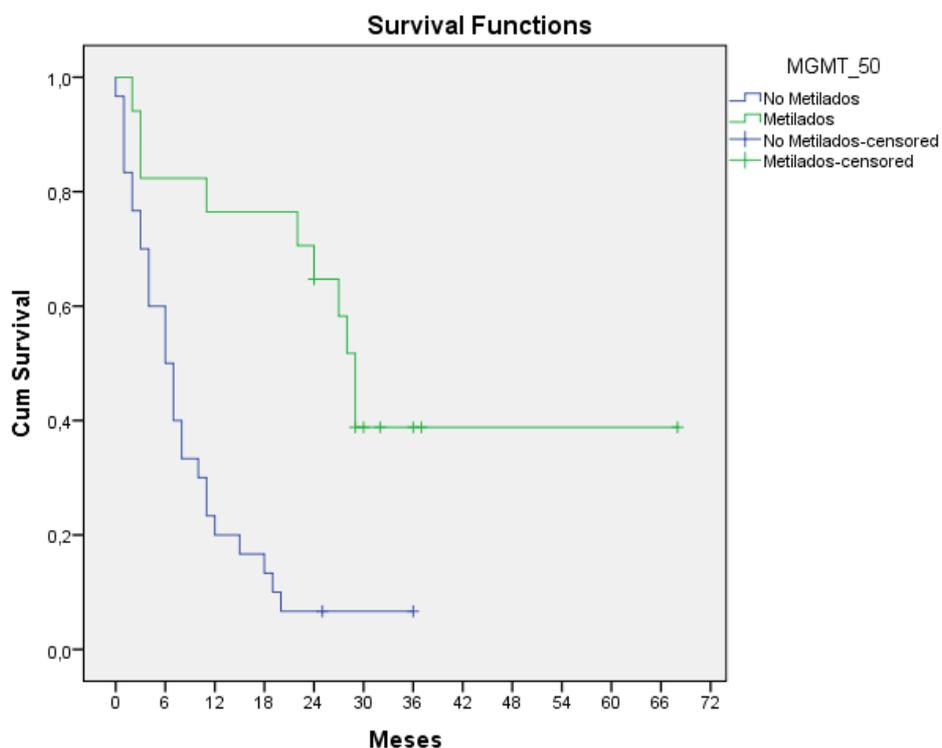
Respecto al punto de corte 25 (pc25), hemos elaborado la *Gráfica 1*. Se ha considerado, en este caso, como “Metilados” (M) los que superan dicho punto de corte ($\geq 25\%$), y “No Metilados” (NM) los que no lo hacen ($< 25\%$). En la gráfica mencionada se observa la curva de supervivencia de los M y NM. La mediana de supervivencia de los M es de 24 meses, mientras la de los NM es de tan solo 7 meses. Respecto a la media, es de 30 meses en los M y de 7,4 meses en los NM. La diferencia entre las dos curvas (M y NM) es estadísticamente significativa, ya que $\chi^2 (1) = 13,645$ y $p = 0,001$.



Gráfica 1. – Curva de Kaplan-Meier de la supervivencia total en meses según el estado de metilación considerando el pc25. Cum Survival – Supervivencia total en la que 1,0 = N47 pacientes vivos, 0,0 = N47 fallecidos.

| Nº pacientes/Meses | 0 | 6 | 12 | 18 | 24 |
|--------------------|----|----|----|----|----|
| Metilados | 27 | 17 | 15 | 15 | 9 |
| No Metilados | 20 | 14 | 0 | 0 | 0 |

Por otra parte, se ha obtenido la *Gráfica 2.*, referente al punto de corte 50. De nuevo, hemos considerado como “Metilados” los pacientes con un grado de metilación \geq a 50% y “No Metilados” aquellos con un valor $<$ a 50%. En dicha gráfica se aprecian las respectivas curvas de supervivencia. La mediana de los M es de 29 meses y de 6 meses en los NM. Respecto a la media, es de 37,5 meses en los M y de 8,97 meses en los NM. La diferencia entre la dos curvas de supervivencia (M y NM) también es estadísticamente significativa ya que $\chi^2(1) = 16,019$ y $p = 0,001$.



Gráfica 2. – Curva de Kaplan-Meier de la supervivencia total en meses según el estado de metilación considerando el pc50. Cum Survival – Supervivencia total en la que 1,0 = N47 pacientes vivos, 0,0 = N47 fallecidos.

| Nº pacientes/Meses | 0 | 6 | 12 | 18 | 24 |
|--------------------|----|----|----|----|----|
| Metilados | 17 | 13 | 12 | 12 | 7 |
| No Metilados | 30 | 7 | 2 | 2 | 2 |

4.3 Comparación de los Chi-cuadrado

Al comparar los valores del Chi-cuadrado de los dos puntos de corte (pc25: $\chi^2 = 13,645$; pc50: $\chi^2 = 16,019$), se denota que el del pc50 es más elevado. Por lo tanto, podemos constatar que la curvas de supervivencia entre M y NM en la *Gráfica 2.*, se apartan más que lo que ocurre en la *Gráfica 1.* Por ello, concluimos que hay una leve superioridad en el pc50 respecto al pc25.

4.4 Correlación entre el grado de metilación y los días de supervivencia

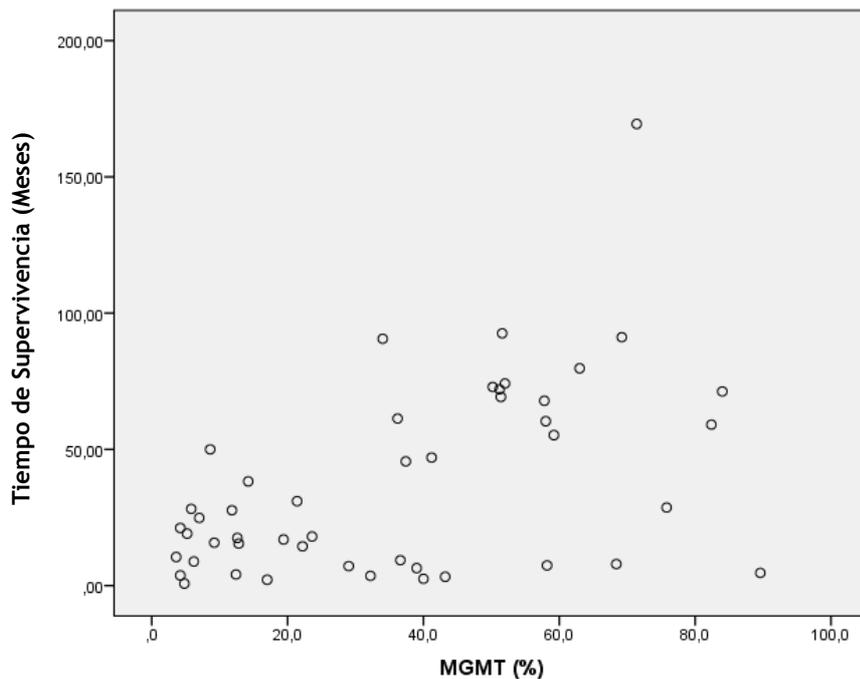
En la *Tabla 2.*, se presenta el coeficiente de correlación entre las variables “% de Metilación” y “Días de Supervivencia”. Se denota una correlación media positiva entre las dos variables ($r(47) = 0,502$ y $p < 0,05$), concluyéndose que, aunque con una confianza de apenas 50,2%, cuanto mayor el porcentaje de metilación, mejor será la tasa de supervivencia de los pacientes.

En la *Gráfica 3.*, se presenta la Dispersión entre las dos variables mencionadas. Se puede apreciar, del 0 a 20% de forma más evidente, que el incremento del grado de metilación parece correlacionarse con más meses de supervivencia. Sin embargo, a partir de los 40%, dicha correlación no es tan fuerte, denotándose una mayor de la dispersión de los datos.

| TABLA 2: Correlación entre “% de Metilación” y “Días de Supervivencia” | | |
|--|---------------------|-----------------------|
| | | Días de Supervivencia |
| % de Metilación | Pearson Correlation | ,502** |
| | Sig. (2-tailed) | ,000 |
| | N | 47 |

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabla 2. – Correlación entre las variables “% de Metilación” y “Días de Supervivencia”



Gráfica 3. – Dispersión “Tiempo de Supervivencia vs Grado de metilación MGMT”

5. Discusión

Al analizar los resultados, podemos hacer algunas consideraciones, comparándolos con a la fundamentación teórica y la bibliografía. Entonces, tendremos en cuenta la caracterización de la muestra, el valor pronóstico de cada punto de corte, la comparación de los dos pc estudiados y, finalmente, la correlación entre grado de metilación y los días de supervivencia.

En primer lugar, respecto a la **caracterización de la muestra**, verificamos que el porcentaje medio de metilación del promotor MGMT es de 35,92%. Sin embargo, aunque el grado de metilación de la muestra varíe entre 3,6% y 89,6%, la mayor parte de los pacientes estudiados presentaba un valor entre 10 y 55% (Fig.1 - b) de Anexos). Sería interesante comparar dichos valores con estudios semejantes para determinar si es lo expectable para un determinada población de pacientes diagnosticados de GBM o si la muestra (N=47) no es suficientemente significativa para predecirlo y defiere de lo encontrado en otros ensayos.

Además, la media de supervivencia en meses (1 mes = 30 días) del grupo analizada ha sido de 14,7m (441,36d), lo que coincide con la supervivencia media de los pacientes que reciben el tratamiento según el protocolo de Stupp *et al* (14,6meses).

En segundo lugar, pasemos a analizar el **valor pronóstico de cada punto de corte**. Para el pc25, la mediana de los M (24 meses), es significativamente superior a la de los NM (7 meses). También la media de los M (30 meses) es mucho más elevada que la de los NM (7,4meses). Esto denota claramente un pronóstico mejor de los M respecto a los NM.

De igual manera, en el pc50, la mediana y media de nos M (29 y 37,5 meses, respectivamente), es mucho superior a las de los NM (6 y 8,97 meses, respectivamente). Asimismo, se verifica que efectivamente los M tienen un mejor pronóstico respecto a los NM. Estos hallazgos coinciden con estudios previos sobre el valor pronóstico cualitativo del grado de metilación promotor MGMT.

En tercer lugar, nos interesa **comparar el valor pronóstico de los dos puntos de corte** estudiados. Al tener en cuenta nuevamente las medianas y medias obtenidas, verificamos que la mediana y la media de los M en el pc50 (29 y 37,5 meses, respectivamente) es superior a la de los M según el pc25 (24 y 30 meses, respectivamente). Ello nos permite denotar con claridad que la supervivencia según el pc50 es más larga que el en pc25, por lo que se concluye que el pc50 posee un mejor valor pronóstico.

De hecho, al comparar las *Gráficas 1. y 2*, observamos que en el pc50, a diferencia del pc25, las dos curvas se apartan desde un momento más inicial. Además, un año después del diagnóstico, el 55,6% de los M seguían vivos según el pc25, al paso que el 71% de los M según el pc50 también.

Además, de los pacientes que siguen vivos, 9 en total, ninguno se encuentra metilado por debajo del 25%. De los 9 supervivientes, 7 poseen un grado de metilación superior a 50%. Es decir, todos superan el pc25, y la mayoría, 7 pacientes, el pc50. Dichos datos, por una parte, permiten concluir que de los que sobreviven en el momento actual, todos se encuentran metilados, independientemente del grado, lo que coincide con la bibliografía y fortalece el valor pronóstico de la metilación del promotor MGMT; y, por otra, sugieren que un grado más alto de metilación se correlacione con una mejor supervivencia.

Finalmente, hemos también analizado los respectivos valores de Chi-cuadrado. Una vez que el χ^2 del pc50 es superior al del pc25, se confirma que las curvas M y NM se apartan más en el pc50 que en el pc20. Es decir, que hay alguna diferencia entre los dos puntos de corte y una leve superioridad predictiva del pc50 respecto al pc20. Sin embargo, la diferencia entre ellos no es muy grande (pc25: $\chi^2 = 13,645$; pc50: $\chi^2 = 16,019$) por lo que no se puede deducir con gran seguridad que el valor pronóstico del pc50 sea mucho más significativo que el pc25.

En cuarto y último lugar, nos enfocaremos en la **relación entre el grado de metilación y los días de supervivencia**. Entonces, hemos relacionado el grado de metilación de la muestra (que varía de 3,6% a 89,6%) con la supervivencia total en días para analizar de que forma se encuentran relacionados, no considerando ningún punto de corte en este caso. La correlación

media positiva entre las dos variables permite efectivamente asociar el incremento del grado de metilación, *per se*, a una mejor supervivencia en días. Sin embargo, la confianza es apenas de 50,2%, por lo que se deduce que no es una correlación muy fuerte, como sería una de 80%, por ejemplo. Por lo tanto, se concluye que la supervivencia del GBM se relaciona con el grado de metilación, pero como la confianza no es elevada, el pronóstico dependerá también de otros factores, como las comorbilidades del paciente, por ejemplo. Además, según la *Gráfica 3*. de dispersión (grado vs meses), parece que hay una mejor correlación entre el porcentaje de metilación y la supervivencia, en valores hasta 20%. Para que dicha correlación fuera más precisa sería necesario volver a calcularla cuando la muestra estuviera ya cerrada, es decir, cuando todos los pacientes ($N=47$) hubieran ya fallecido.

6. Conclusión

El objetivo de este trabajo ha sido determinar de forma cuantitativa el valor pronóstico de la metilación del promotor del MGMT en el GBM, en oposición a estudios que lo han hecho de forma cualitativa. Es decir, observar en distintos grados de metilación, a través de los pc25 y pc50, la relación con el valor pronóstico.

Este estudio es importante y relevante no sólo para la decisión de dar o no TMZ por el beneficio terapéutico para el paciente; sino también para indicar una directriz de actuación a los médicos que permita gestionar los recursos relacionados con la salud de estos pacientes de forma, evitando gastos innecesarios.

Entonces, podemos hacer las siguientes conclusiones:

1) En ambos puntos de corte se apura un valor pronóstico claro en cuanto se incrementa la supervivencia media. De hecho, ninguno de los No Metilados ha sobrevivido. Efectivamente, se confirma que el pronóstico de los Metilados es en los dos puntos de corte mejor que el de los No Metilados, como se encuentra descrito en la literatura.

2) Al comparar los dos pc, hay que tener en cuenta aspectos que favorecen la superioridad del pc50 y aspectos que se oponen a ella.

Por una parte, la curva de los M en el pc50 es siempre superior a la de los NM, lo que no ocurre en el pc25 en los primeros 6 meses. De hecho, la media y mediana de los Metilados en el pc50 es superior a la de los Metilados del pc25. Además, de los 9 pacientes que siguen actualmente vivos, la mayoría (7) supera el pc50.

Por otra parte, el hecho del *N* ser reducido, hace que las gráficas pierdan alguna sensibilidad y que el número de pacientes vivos con un grado de metilación superior a 50% (7) quizás no sea representativo lo suficiente para predecir el pronóstico en una población más grande, aunque suponga una pista para estudios futuros. A parte de eso, aunque la media y la mediana favorezcan el

valor pronóstico del pc50, los valores de Chi-cuadrado no son muy distintos, no confirmando una gran superioridad del pc50 respecto al pc25.

Considerando todos los elementos referidos, se concluye que el pc50 presenta un valor pronóstico de leve superioridad respecto al pc25.

Finalmente, me parece importante mencionar la necesidad de otros estudios que analicen el valor pronóstico de la metilación del promotor MGMT con una muestra más grande, y de obtener la correlación entre el grado de metilación y el tiempo cuando la muestra esté ya cerrada, a fin de obtener resultados más precisos. Además, sería igualmente interesante estudiar, a parte de a supervivencia total, la progresión libre de enfermedad (PLE o PFS de *Progression Free Survival*).

A modo de reflexión, me gustaría subrayar la importancia de las varias áreas científicas a fin de llevar a cabo un estudio como este (y muchos otros relacionados con la Medicina) que supone la participación de un equipo de médicos, de la colaboración de investigadores del área de Secuenciación y Genómica, y de conocimientos de Análisis Estadística. El trabajo de las varias componentes de un equipo multidisciplinar del cual juego como estudiante solamente un rol modesto pero gratificante, me parece un ejemplo perfecto del impacto del trabajo científico, con frutos de aprendizaje y conocimiento, en el tratamiento y salud de los pacientes.

7. Bibliografía

1)

Uddin ABMS. Neurologic Manifestations of Glioblastoma Multiforme [Internet]. Medscape. 2017 [cited 2017Mar7]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1156220-overview>

2)

Lobera A. Imaging in Glioblastoma Multiforme [Internet]. Medscape. 2017 [cited 2017Mar7]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/340870-overview>

3)

Bruce JN. Glioblastoma Multiforme [Internet]. Medscape. 2016 [cited 2017Mar7]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/283252-overview>
<http://emedicine.medscape.com/article/283252-overview>

4)

Glioblastoma (GBM) [Internet]. Glioblastoma (GBM) | American Brain Tumor Association. [cited 2017Mar7]. Available from: <http://www.abta.org/brain-tumor-information/types-of-tumors/glioblastoma.html>

5)

Types of Brain and Spinal Cord Tumors in Adults. (2014, March 5). Retrieved March 13, 2017, from <https://www.cancer.org/cancer/brain-spinal-cord-tumors-adults/about/types-of-brain-tumors.html>
AAVV written by The American Cancer Society medical and editorial content team

6)

Esteller, Manel, et al. "Inactivation of the DNA-Repair gene MGMT and the clinical response of Gliomas to alkylating agents." The New England Journal of Medicine, Nov. 2000, pp. 1350–1354, www.nejm.org. Accessed 25 Sept. 2015.

7)

Hegi, Monika E, et al. "MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma." *The New England Journal of Medicine*, 10 Mar. 2005, pp. 997–1003, www.nejm.org. Accessed 19 Sept. 2012.

8)

Christians, A., Hartmann, C., & Benner, A. (2012, March). Prognostic Value of Three Different Methods of MGMT Promoter Methylation Analysis in a Prospective Trial on Newly Diagnosed Glioblastoma. *Plos One*, 7(3), 1-9. Retrieved February 23, 2016, from www.plosone.org

9)

Quillien, V., Lavenu, A., Sanson, M., Legrain, M., & Dubus, P. (2014, January). Outcome-based determination of optimal pyrosequencing assay for MGMT methylation detection in glioblastoma patients. *Journal of Neurooncology*, 116, 487-496. doi:DOI 10.1007/s11060-013-1332-y

10)

Baur, M., Preusser, M., Piribauer, M., Elandt, K., Hassler, M., & Hudec, M. (2010). Frequent MGMT (06-methylguanine-DNA methyltransferase) hypermethylation in long-term survivors of glioblastoma: a single institution experience. *Radiology and Oncology Journal*, 44(2), 113-120. doi:doi:10.2478/v10019-010-0023-y

11)

Meir, E. G. Van, C. G. Hadjipanayis, A. D. Norden, H. K. Shu, P. Y. Wen, and J. J. Olson. "Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 60.3 (2010): 166-93. Web.

12)

The Cancer Genome Atlas Research Network. "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." *Nature* 455 (2008): 1061-068. Web. doi:10.1038/nature07385

13)

Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I. V., & Hamada, J. (2011). Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers*, 3(4), 3242-3278. doi:10.3390/cancers3033242

14)

Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., et al. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98-110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020

15) Marko, N. F., Quackenbush, J., & Weil, R. J. (2011). Why Is There a Lack of Consensus on Molecular Subgroups of Glioblastoma? Understanding the Nature of Biological and Statistical Variability in Glioblastoma Expression Data. *PLoS ONE*, 6(7). doi:10.1371/journal.pone.0020826

15)

Gaillard, Frank. "Stupp protocol for glioblastoma | Radiology Reference Article." Radiopaedia.org. Accessed May 02, 2017. <https://radiopaedia.org/articles/stupp-protocol-for-glioblastoma>.

16)

Alonso, Ángel . "Genética y Cáncer." Instituto Roche. Accessed May 02, 2017. https://www.institutoroche.es/geneticaycancer/area_molecular/tecnicas_de_diagnostico_molecular/deteccion_de_mutaciones_epigeneticas.html.

8. Anexos

Tabla 1 – Caracterización de la muestra respecto a la Edad, Grado de Metilación, y Días de Supervivencia

| | Media (\bar{X}) | Mediana (Md) | Desvío Patrón (σ) | Valor Mínimo ($X_{\min.}$) | Valor Máximo ($X_{\max.}$) | N |
|-----------------------|------------------------|-----------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----|
| Edad | 62.09 | 61.00 | 10.266 | 34 | 85 | 47 |
| % de Metilación | 35.92 | 36.20 | 25.274 | 3.6 | 89.6 | 47 |
| Días de Supervivencia | 441.36 | 298.00 | 419.417 | 9 | 2033 | 47 |

Tabla 2 – Datos de las variables MGMT_25, MGMT_50, Tipo de Resección, y Exitus

| Variables | Categorías | nº | % |
|-------------------|--------------|----|-------|
| MGMT_25 | Sí | 27 | 57.4 |
| | No | 20 | 42.6 |
| | Total | 47 | 100.0 |
| MGMT_50 | Sí | 17 | 36.2 |
| | No | 30 | 63.8 |
| | Total | 47 | 100.0 |
| Tipo de Resección | Completa | 17 | 36.2 |
| | Biopsia | 19 | 40.4 |
| | Subtotal | 11 | 23.4 |
| | Total | 47 | 100.0 |
| Exitus | Sí | 38 | 80.9 |
| | No | 9 | 19.1 |
| | Total | 47 | 100.0 |

Tabla 3 - Medidas de estadística descriptiva de la variable “Días de Supervivencia” para el pc25

| % de Metilación | Medida Estadística | Días Supervivencia | nº |
|-----------------|--------------------|--------------------|----|
| ≥ 25% | Media | 604.63 | 27 |
| | Desvío Patrón | 479.321 | |
| < 25% | Media | 220.95 | 20 |
| | Desvío Patrón | 149.921 | |

Tabla 4 - Medidas de estadística descriptiva de la variable “Días de Supervivencia” para el pc50

| % de Metilación | Medida Estadística | Días Sobrevivencia | nº |
|-----------------|--------------------|--------------------|----|
| ≥ 50% | Media | 764.94 | 17 |
| | Desvío Patrón | 469.444 | |
| <50% | Media | 258.00 | 30 |
| | Desvío Patrón | 247.555 | |

Tabla 5 - a) Medias y Medianas de la Supervivencia Total pc25 y b) Log Rank

| a) Means and Medians for Survival Time | | | | | | | | | |
|--|---------|----------|------------|-------------------------|-------------|----------|------------|-------------------------|-------------|
| | Mean | | | | Median | | | | |
| | MGMT_25 | Estimate | Std. Error | 95% Confidence Interval | | Estimate | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
| | | | | Lower Bound | Upper Bound | | | Lower Bound | Upper Bound |
| No Metilados | 7,350 | 1,094 | 5,206 | 9,494 | 7,000 | ,730 | 5,569 | 8,431 | |
| Metilados | 30,040 | 5,297 | 19,659 | 40,422 | 24,000 | 6,528 | 11,205 | 36,795 | |
| Overall | 20,385 | 3,485 | 13,555 | 27,215 | 10,000 | 2,285 | 5,522 | 14,478 | |

Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

| b) Overall Comparisons | | | |
|---|------------|----|------|
| | Chi-Square | df | Sig. |
| Log Rank (Mantel-Cox) | 13,645 | 1 | ,000 |
| Test of equality of survival distributions for the different levels of MGMT_25. | | | |

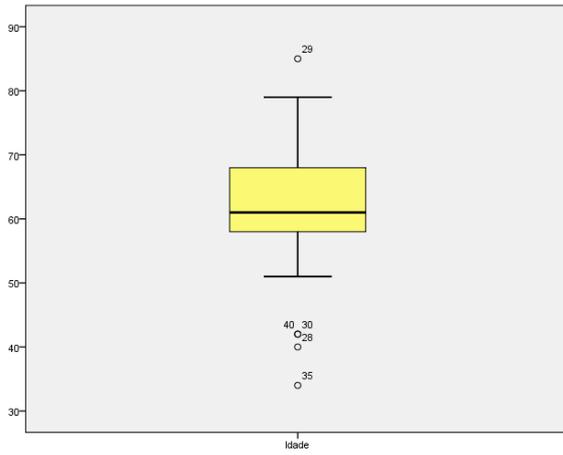
Tabla 6 – a) Medias y Medianas de la Supervivencia Total pc50 y b) Log Rank

| a) Means and Medians for Survival Time | | | | | | | | | |
|---|---------|----------|------------|-------------------------|-------------|----------|------------|-------------------------|-------------|
| | Mean | | | | Median | | | | |
| | MGMT_50 | Estimate | Std. Error | 95% Confidence Interval | | Estimate | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
| | | | | Lower Bound | Upper Bound | | | Lower Bound | Upper Bound |
| No Metilados | 8,967 | 1,646 | 5,741 | 12,192 | 6,000 | 1,369 | 3,316 | 8,684 | |
| Metilados | 37,535 | 6,363 | 25,063 | 50,007 | 29,000 | 1,257 | 26,536 | 31,464 | |
| Overall | 20,385 | 3,485 | 13,555 | 27,215 | 10,000 | 2,285 | 5,522 | 14,478 | |
| Estimation is limited to the largest survival time if it is censored. | | | | | | | | | |

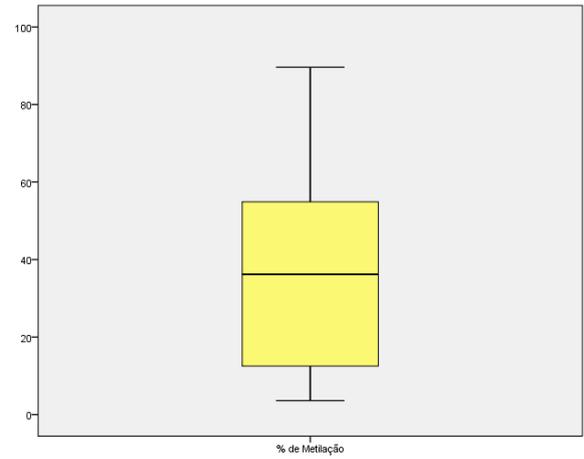
| b) Overall Comparisons | | | |
|---|------------|----|------|
| | Chi-Square | df | Sig. |
| Log Rank (Mantel-Cox) | 16,019 | 1 | ,000 |
| Test of equality of survival distributions for the different levels of MGMT_50. | | | |

Figura 1 - Boxplot's de la muestra referente a **a)** la Edad, **b)** Grado de metilación, y **c)** Días de supervivencia.

a)



b)



c)

