Factores pronósticos en astrocitomas anaplásicos

Marta Brell Doval

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

PROGRAMA: RECERCA EN CIRURGÍA NEUROLÓGICA (1998-2000)

FACTORES PRONÓSTICOS EN ASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS

Memoria para optar al Grado de Doctor en
Medicina y Cirugía por

MARTA BRELL DOVAL

Dirigido por los Profesores Dr. Enrique Ferrer Rodríguez,
Dr. Juan José Acebes Martín y Dra. Avelina Tortosa i Moreno

PROF. DR. DON ENRIQUE FERRER RODRÍGUEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA Y ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA Y JEFE DEL SERVICIO DE NEUROCIRUGÍA DEL HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA

CERTIFICO:

Que Doña Marta Brell Doval ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral:

FACTORES PRONÓSTICOS EN ASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS

Revisado EL PRESENTE TRABAJO, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedo conforme con su presentación para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en Barcelona a de de 2010.

PROF. DR. DON JUAN JOSÉ ACEBES MARTÍN, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA Y JEFE DEL SERVICIO DE NEUROCIRUGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE BELLVITGE.

CERTIFICO:

Que Doña Marta Brell Doval ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral:

FACTORES PRONÓSTICOS EN ASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS

Revisado EL PRESENTE TRABAJO, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedo conforme con su presentación para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en Barcelona a de de 2010.

PROF. DRA. DOÑA AVELINA TORTOSA I MORENO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMERÍA FUNDAMENTAL DE LA ESCUELA DE ENFERMERÍA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA

CERTIFICO:

Que Doña Marta Brell Doval ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral:

FACTORES PRONÓSTICOS EN ASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS

Revisado EL PRESENTE TRABAJO, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedo conforme con su presentación para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en Barcelona a de de 2010.

A mi madre, por ser tan especial, tan única

y porque te debo todo lo que soy.

"We think that the time has come that every neurosurgeon should be aware of this fundamental knowledge, at least if he still wants to play a key-role in the modern treatment of primary brain tumours, where gene therapy will be part of it soon".

(Van de Kelft, 1997)

PRESENTACIÓN Y AGRADECIMIENTOS

PRESENTACIÓN

La presente tesis doctoral fue inscrita durante mi último año de residencia en Neurocirugía en el Hospital Clínic de Barcelona, tras la finalización del Programa de Doctorado. El interés que despertó en mí la investigación en el campo de la Neurooncología, junto con la oportunidad que brindaba el Hospital Clínic a los residentes que concluían su formación, hizo que solicitara la beca "Premio Fin de Residencia", la cual me fue concedida unos meses más tarde con el proyecto titulado:

ANALISIS DE FACTORES PRONOSTICOS CLINICO - EPIDEMIOLOGICOS Y MOLECULARES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SOBREVIDA EN PACIENTES CON GLIOMAS DE ALTO GRADO

Dicho proyecto centraba sus bases en la idea original de la memoria realizada para la inscripción de la tesis, pero con objetivos más ambiciosos, ampliando el enfoque de la investigación no sólo a los astrocitomas anaplásicos sino también a otros tipos de gliomas de alto grado.

En esta memoria se recogen los frutos de la línea de trabajo iniciada entonces, y ha sido estructurada en tres capítulos precedidos de una introducción general. A su vez cada uno de los capítulos consta de un primer apartado de justificación y objetivos, seguido de otro de material y métodos, discusión y conclusiones.

En la última parte, se encuentran los anexos con información que puede ser útil para el lector en relación a las tablas y escalas empleadas. Además, los tres capítulos han sido publicados o aceptados para su publicación en revistas indexadas, adjuntándose los correspondientes artículos en los Anexos VII, VIII, y IX:

Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas.
Brell M, Tortosa A, Verger E, Gil JM, Viñolas N, Villá S, Acebes JJ, Caral L, Pujol T, Ferrer I, Ribalta T, Graus F.
Clin Cancer Res. 2005 Jul 15;11(14):5167-74

Factor de Impacto en 2005: 5.715

Implicación del patrón radiológico en el pronóstico de los tumores oligodendrogliales; correlación con el perfil genético.

Brell M, Castañer S, Pujol T, Boluda S, Ribalta T, Bruna J, Martinez M, Verger E, Villà S, Viñolas N, Gil M, Graus F, Tortosa A.

Rev Neurol 2010 (En prensa)

Factor de Impacto en 2010: 1.234

O6-Methylguanine-DNA methyltransferase protein expression by immunohistochemistry in brain and non-brain systemic tumours: systematic review and meta-analysis of correlation with methylation-specific polymerase chain reaction.

Brell M, Ibanez J, Tortosa A.

BMC Cancer 11(1):35 (2011)

Factor de Impacto en 2010: 2.736

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Avelina Tortosa su incondicional ayuda, constante ánimo y buenos consejos para la realización y conclusión de este trabajo. Además de ser un referente en el terreno académico, querría destacar de ella su enorme valor humano y su infinita paciencia demostrados durante todos estos años. Ha supuesto para mí un apoyo en todos los ámbitos, y siento que siempre estaré en deuda con ella.

También quiero expresar mi agradecimiento a los Drs. Luis Caral, Enrique Ferrer y Francesc Graus que despertaron mi interés por la Neurooncología durante mis años de residencia en el Hospital Clínic de Barcelona, por sus enseñanzas y su dedicación a los pacientes neurooncológicos.

A los que fueron mis compañeros del Hospital Bellvitge de Barcelona, entre 2001 y 2005, a los miembros del Servicio de Neurocirugía, médicos residentes, staff y enfermeras con los que compartí el trabajo de esos años, y en especial a su Jefe de Servicio, Juan José Acebes que además de codirigir esta tesis, siempre entendió y valoró mi dedicación a la misma. Querría agradecer también al Dr. Isidro Ferrer, director de la Unidad de Neuropatología del Hospital Universitario de Bellvitge la oportunidad que me brindó para iniciarme en el mundo de la investigación básica, y disponer de la infraestructura necesaria para acometer esta tarea. También al personal del Laboratorio de Neuropatología del Campus de Bellvitge en especial a Rosa Rivera y Margarita Martín por su ayuda desinteresada y su paciencia. A Judith por su colaboración.

Tampoco puedo dejar de agradecer a Javier su apoyo constante y su paciencia conmigo además de su valiosa ayuda.

Por último, y sobre todo, quiero dar las gracias a los pacientes y sus familiares que en circunstancias muy difíciles durante los momentos de diagnóstico de su enfermedad, asumen con gran generosidad la responsabilidad de participar en la investigación clínica que se desarrolla todos los días en los hospitales de nuestro país.

Palma de Mallorca, noviembre de 2010.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 17

1. EPIDEMIOLOGÍA Y ASPECTOS GENERALES 21

2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS GLIOMAS ANAPLÁSICOS 24

2.1. ASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS 24

2.1.1 GENETICA MOLECULAR 27

2.2. OLIGODENDROGLIOMAS ANAPLÁSICOS 28

2.2.1 GENETICA MOLECULAR 31

2.3. OLIGOASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS 34

2.3.1 GENETICA MOLECULAR 35

3. TRATAMIENTO ACTUAL 38

3.1. CONSIDERACIONES SOBRE EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LOS GLIOMAS ANAPLÁSICOS 40

4. VALORACIÓN PRONÓSTICA: UN PROBLEMA CLÍNICO 48

5. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS 51

5.1. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS 53

5.1.1. CLÍNICOS 53

5.1.2. RADIOLÓGICOS 53

5.1.3. HISTOLÓGICOS 55

5.1.4. GRADO DE RESECCIÓN 55

5.2. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS MOLECULARES 57

5.2.1. O6-METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA . 60

5.2.1.1. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN 61

5.2.1.2. PRINCIPALES TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE MGMT 65

5.2.2. PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD 1p19q 70

Capítulo I: VALOR PRONÓSTICO DE LA O6-METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA VALORADA MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR Y EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN UNA SERIE DE GLIOMAS ANAPLÁSICOS 77

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 79

2. HIPÓTESIS 83

3. OBJETIVOS 84

4. MATERIAL Y MÉTODOS 85

4.1. RECOGIDA DE MUESTRAS Y SELECCIÓN DE PACIENTES 85

4.2. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO 87

4.3. ANÁLISIS MEDIANTE PCR ESPECÍFICA PARA LA DETECCIÓN DE METILACIÓN (MSP) 88

4.3.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS TUMORALES 89

4.3.2. TRATAMIENTO CON BISULFITO DEL ADN TUMORAL 90

4.3.3. PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN 91

4.4. ANALISIS ESTADÍSTICO 92

5. RESULTADOS 94

5.1. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MGMT Y EL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *MGMT* 97

5.2. CORRELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE MGMT Y/O METILACIÓN DE MGMT Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS 99

5.3. VALOR PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DE MGMT Y DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR 101

5.3.1. SUPERVIVENCIA GLOBAL 101

5.3.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN 105

6. DISCUSIÓN 108

6.1. RELACIÓN ENTRE METILACIÓN DEL PROMOTOR Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 108

6.1.1. LA METILACIÓN COMO MECANISMO DE INACTIVACIÓN DE UN GEN 114

6.1.2. OTROS MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN / ACTIVIDAD DE MGMT 118

6.1.3. HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL 121

6.1.4. ASPECTOS METODOLÓGICOS 124

6.2. MGMT COMO FACTOR PRONÓSTICO O FACTOR PREDICTIVO 134

6.2.1. VALOR PRONÓSTICO DE MGMT 135

6.2.2. VALOR PREDICTIVO DE MGMT 150

7. CONCLUSIONES 154

Capítulo II: EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA O6-METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA VALORADA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA EN TUMORES CEREBRALES Y SISTÉMICOS: REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN CON LOS RESULTADOS DE LA PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MSP) 155

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 157

2. HIPÓTESIS 163

3. OBJETIVOS 164

4. MATERIAL Y MÉTODOS 165

4.1. REVISIÓN DE LA LITERATURA 167

4.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE LOS ESTUDIOS 169

4.3. TEST PROBLEMA ("*INDEX TEST*") Y TEST DE REFERENCIA ("*REFERENCE TEST*") ……...…… 169

4.4. VALORACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS ESTUDIOS SELECCIONADOS 170

4.5. EXTRACCIÓN DE LOS DATOS 176

4.6. ESTATEGIA DE ANÁLISIS 177

5. RESULTADOS 182

5.1 RESULTADO DE LA BÚSQUEDA DE EVIDENCIAS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS 182

5.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS 195

5.3 ANÁLISIS DE LOS DATOS 200

6. DISCUSIÓN 220

6.1. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DE TESTS DIAGNÓSTICOS: REVISIONES SISTEMÁTICAS Y META-ANÁLISIS 220

6.2. IHQ *vs* MSP EN EL ANÁLISIS DE MGMT 228

6.3. LIMITACIONES DE LA PRESENTE REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS 232

6.4. POTENCIAL IMPACTO DE LA PRESENTE REVISIÓN SISTEMÁTICA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA 233

7. CONCLUSIONES 235

Capítulo III: IMPLICACIÓN DEL PATRÓN RADIOLÓGICO EN EL PRONÓSTICO DE LOS TUMORES OLIGODENDROGLIALES 237

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 239

2. HIPÓTESIS 242

3. OBJETIVOS 243

4. MATERIAL Y MÉTODOS 244

4.1. RECOGIDA DE MUESTRAS Y SELECCIÓN DE PACIENTES 244

4.2. ANÁLISIS RADIOLÓGICO 245

4.3. ESTUDIO MOLECULAR 248

4.4. VARIABLES CLÍNICAS 248

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 248

5. RESULTADOS 250

6. DISCUSIÓN 271

7. CONCLUSIONES 280

CONCLUSIONES GENERALES 281

ANEXOS 285

Anexo I: ESCALA DE KARNOFSKY 287

Anexo II: CRITERIOS DE MACDONALD PARA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN GLIOMAS MALIGNOS SUPRATENTORIALES 288

Anexo III: MINI MENTAL STATE EXAMINATION (MMSE) 289

Anexo IV: EVALUACIÓN QUADAS 291

Anexo V: EVALUACIÓN STARD 292

Anexo VI: INDICE DE TABLAS Y FIGURAS 295

Anexo VII: ***Prognostic Significance of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas.***
Brell M, Tortosa A, Verger E, Gil JM, Viñolas N, Villa S, Acebes JJ, Caral L, Pujol T, Ferrer I, Ribalta T, Graus F.
Clin Cancer Res 2005;11(14): 5167-5174 301

Anexo VIII: ***Implicación del patrón radiológico en el pronóstico de los tumores oligodendrogliales; correlación con el perfil genético.***
Brell M, Castañer S, Pujol T, Boluda S, Ribalta T, Bruna J, Martinez M, Verger E, Villà S, Viñolas N, Gil M, Graus F, Tortosa A.
Rev Neurol 2010 (En prensa) 309

Anexo IX: ***O6-Methylguanine-DNA methyltransferase protein expression by immunohistochemistry in brain and non-brain systemic tumours: systematic review and meta-analysis of correlation with methylation-specific polymerase chain reaction.***
Brell M, Ibanez J, Tortosa A.
BMC Cancer 2011: 11(1):35 317

BIBLIOGRAFÍA 331

ABREVIATURAS

AA: Astrocitomas anaplásicos

ADN: Acido desoxiribonucleico

AGT: O^6 -Alkilguanina- ADN alkiltransferasa

ARN: Acido ribonucleico

C: Citosina

CSC: *Cancer stem cells*

E: Especificidad

EA: Ependimoma anaplásico

FISH: *Fluorescent in situ hybridization*

GA: Glioma anaplásico

GB: Glioblastoma

GBG: Glioma de bajo grado

GFAP: Proteína fibrilar glial ácida

HR: *Hazard ratio*

HTIC: Hipertensión intracranal

IC: Intervalo de confianza

IDH1: Isocitrato deshidrogenasa 1

IHQ: Immunohistoquímica

Kb: Kilobases

KDa: KiloDalton

KPS: Puntuación en la Escala de Karnofsky

LOH: Pérdida de heterocigosidad

LPSNC: Linfoma primario del sistema nervioso central

LR: Likelihood ratio

MGMT: O^6 Metilguanina- ADN-Metiltransferasa

MSP: "*Methylation-specific PCR"*

OA: Oligodendrogliomas anaplásicos

OAA: Oligoastrocitomas anaplásicos

OAs: Oligoastrocitoma

OR: Odds ratio

ORd: Odds ratio diagnóstica

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

rCBF: *"regional Cerebral Blood Flow"*

rCBV: *"regional Cerebral Blood Volume"*

Rpm: Revoluciones por minuto

RM: Resonancia magnética

S: Sensibilidad

SNC: Sistema Nervioso Central

TC: Tomografía computerizada

U: Uracilo

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El término glioma fue introducido por Virchow en 1883 para definir aquellas neoplasias primarias del sistema nervioso originadas a partir del tejido glial. En 1926, Bailey y Cushing llevaron a cabo el primer intento de clasificación según la morfología de las células, recogiéndola en su tratado *"Classification of the Tumors of the Glioma Group on an Histogenetic Basis with a Correlation Study of Prognosis".* Esto condujo a la observación en la clínica de que la supervivencia de los pacientes se relacionaba con aspectos anatomopatológicos del tumor como son el subtipo histológico, la presencia de atipia nuclear o necrosis, la celularidad y la proliferación vascular. Por ello, desde entonces y hasta nuestros días nuevas clasificaciones propuestas por diversos autores se han sucedido, siempre con la intención de identificar subgrupos de pacientes con similar evolución clínica y pronóstico parecido.

En la actualidad, la investigación dirigida al conocimiento de los factores pronósticos de supervivencia y predictivos de respuesta a la terapéutica en estos tumores, sigue siendo de interés prioritario y la clasificación histopatológica universalmente aceptada es la elaborada por la OMS, que data de 1993 (Kleihues et al., 1993) y que fue actualizada por última vez en 2006 (Louis et al., 2007).

Además de los datos histopatológicos, determinadas variables clínicas han demostrado tener de igual modo, una importante influencia pronóstica. De entre ellos, la edad del paciente en el momento del diagnóstico y su situación funcional valorada por escalas de calidad de vida (Burger y Green, 1987; Salminen et al., 1996) han sido las variables clínicas que de manera reiterada han permanecido como factores de pronóstico independientes en los análisis multivariantes de supervivencia.

Por otra parte, el gran avance en las técnicas de neuroimagen acontecido en las últimas décadas y su mayor disponibilidad cada vez en más centros de nuestro entorno, ha permitido profundizar en la búsqueda de características radiológicas con valor pronóstico. Así, la localización anatómica del tumor en el neuroeje, el volumen planimétrico y geométrico del mismo, la presencia de necrosis radiológica, la captación de contraste, el depósito de radiotrazadores isotópicos, el análisis espectroscópico, o el patrón de perfusión-difusión de las lesiones, han sido y continúan siendo en la actualidad objeto de estudio y análisis por

numerosos grupos de investigación, habiéndose demostrado su influencia pronóstica en algunas series (Cao et al., 2006).

Del mismo modo, el desarrollo y la universalización en las últimas décadas de numerosas técnicas de laboratorio, ha permitido también analizar el valor pronóstico de determinadas características biológicas tumorales como el índice de proliferación celular (Ki-67), los diferentes tipos de necrosis, etc. (Kleihues y Ohgaki, 1999).

Sin embargo, el gran avance en el conocimiento de la biología molecular de los gliomas acontecido fundamentalmente en los últimos años, ha permitido demostrar que muchas de las variables clínicas, radiológicas o histológicas clásicas pierden su valor pronóstico si se analizan conjuntamente con los nuevos aspectos de la genética tumoral (Cairncross et al., 1998; Shinoura et al., 1996; Zhu et al., 1996).

Los conceptos actuales de la biología molecular establecen la hipótesis de que las alteraciones en las vías genéticas que regulan la susceptibilidad a la apoptosis o muerte celular programada, están implicadas en la evolución hacia la malignización de los tumores y son también responsables de su resistencia intrínseca a los tratamientos. Por ello, los esfuerzos en investigación deben dirigirse en la actualidad, hacia la descripción de la carga genética tumoral, y hacia la detección de genes defectuosos. Ello permitirá un conocimiento más preciso del comportamiento tumoral, una predicción más ajustada del pronóstico del paciente al tiempo que se abrirán nuevas dianas y por tanto nuevas opciones terapéuticas (Fueyo et al., 1998; Fueyo y Gómez-Manzano, 1998; Rainov et al., 1997). De este modo, la aplicabilidad de la genética molecular será prioritaria en un futuro muy próximo, contribuyendo a la toma de decisiones en la práctica clínica.

Ahora bien, la relevancia final de cualquier factor genético deberá siempre medirse junto con la de los parámetros clínicos clásicos con valor predictivo y/o pronóstico conocido como son la edad, la puntuación en la escala de Karnofsky o el grado histológico del tumor (Ino et al., 2000; Newcomb et al., 1998; Olson et al., 1998; Rasheed et al., 1999).

Todos estos aspectos, tienen especial relevancia en el caso específico de los gliomas anaplásicos (GA) (grado III de la OMS) cuyo comportamiento y evolución clínica son especialmente heterogéneos (Donahue et al., 1997).

Es una realidad bien conocida el hecho de que gliomas con características histopatológicas muy similares presentan una amplia variabilidad en su evolución y en su respuesta a una misma terapia y por ello, en su pronóstico (Sawamura y de Tribolet, 2000). La presente tesis doctoral se ha centrado fundamentalmente en el estudio de este subgrupo de gliomas.

1. EPIDEMIOLOGÍA Y ASPECTOS GENERALES

Los datos epidemiológicos más actualizados y detallados referentes a tumores cerebrales provienen de Estados Unidos. Según el Registro Central de Tumores Cerebrales de los Estados Unidos (*Central Brain Tumor Registry of the United Status* - CBTRUS 2007-2008) en su último informe correspondiente al periodo 2007-2008 (CBTRUS, 2009) la incidencia de tumores primarios y malignos del SNC en general (excluyendo linfomas, leucemias, tumores hipofisarios, pineales y tumores olfatorios de la cavidad nasal) fue de 4.52 a 8.84 casos/100.000 habitantes-año.

Esta tasa fue algo mayor en varones (7.6 casos/100.000 habitantes-año) que en mujeres (5.3 casos/100.000 habitantes-año).

Así mismo, la incidencia fue mayor en los países más desarrollados respecto a los de menor desarrollo.

La tasa de prevalencia para tumores cerebrales en adultos estimada según el CBTRUS es de 29.5 casos/100.000 habitantes para tumores malignos, 97.5 casos/100.000 habitantes para tumores benignos y 3.8 casos/100.000 habitantes para tumores de comportamiento incierto.

En los países occidentales, las neoplasias del SNC representan por tanto el 1.4-2% de todas las neoplasias y son responsables del 2.4% de las muertes por cáncer.

No obstante, a pesar de su relativa baja incidencia, el impacto social de esta entidad es desproporcionadamente elevado. Así, se calcula que la media de años de vida perdidos en los pacientes afectos de un glioma maligno de es alrededor de 20 años/paciente, siendo en un estudio británico la primera causa de años de vida perdidos entre un total de 17 enfermedades (Burnet et al., 2005).

No disponemos de datos epidemiológicos detallados sobre la incidencia y prevalencia de los tumores del SNC en España, pero sí de la mortalidad atribuible a los mismos (Tabla 1.).

Tabla 1. Mortalidad por tumores del SNC en España

Año	Nº varones	Tasa*	Nº mujeres	Tasa*
2007	1.462	6,60	1.096	4,83
2006	1.387	6,45	1.120	5,04
2005	1.289	6,07	1.102	5,02
2004	1.338	6,39	1.041	4,80
2003	1.410	6,65	1.035	4,48
2002	1.337	6,24	1.050	4,0
2001	1.208	5,67	988	3,81
2000	1.224	5,84	959	3,63
1999	1.127	5,44	911	3,85
1998	1.217	5,99	885	3,49
1997	1.124	5,60	895	3,60
1996	1.130	5,64	849	3,53
1992	939	5,14	685	3,71

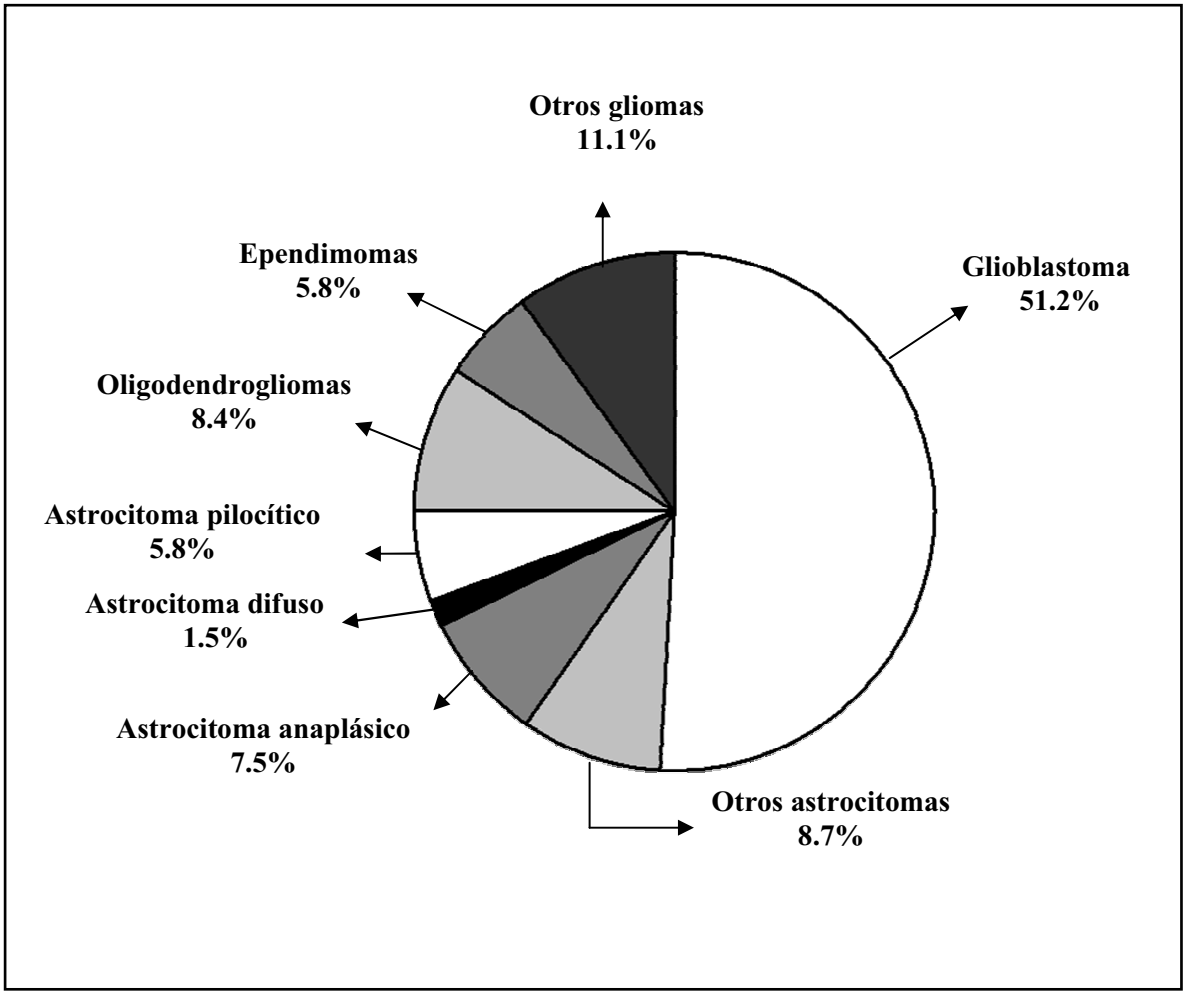
*Tasa por 10^5 habitantes/año

Fuente: Centro Nacional de Epidemiología (http://cne.isciii.es).

Respecto a los diversos subtipos histológicos, los astrocitomas son los tumores cerebrales primarios más frecuentes constituyendo más del 50% de todos ellos (Figura 1.), con una incidencia anual estimada de 5-7 nuevos casos/100.000 habitantes (Kleihues et al., 1993; Salmon et al., 1994).

Constituyen la segunda causa de muerte por cáncer de la población por debajo de los 35 años de edad.

Figura 1. Distribución de los tumores primarios del SNC por subtipos histológicos CBTRUS 2004-2005 (n = 26.630) (CBTRUS, 2008)



2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS GLIOMAS ANAPLÁSICOS

Entendemos por gliomas anaplásicos (GA) o de grado III de la OMS aquellos gliomas infiltrativos y malignos, que afectan fundamentalmente a pacientes adultos, se localizan preferentemente en los hemisferios cerebrales y que se caracterizan histológicamente por presentar atipia nuclear, aumento de la celularidad y actividad proliferativa relevante. A diferencia de los glioblastomas (GB), los GA no presentan proliferación microvascular ni necrosis.

Los GA pueden originarse por progresión a partir de un glioma precursor de bajo grado (grado II de la OMS) o bien surgir *de novo* sin evidencia de lesión precursora de bajo grado previa.

A su vez, poseen una tendencia inherente a progresar a GB (Louis et al., 2007). De entre los GA, los astrocitomas anaplásicos (AA) están constituidos por astrocitos neoplásicos y son el subtipo histológico más frecuente, mientras que los oligoastrocitomas anaplásicos (OAA) y los oligodendrogliomas anaplásicos (OA) se caracterizan por la presencia de oligodendrocitos y astrocitos neoplásicos (Smith y Jenkins, 2000).

2.1. ASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS

Los astrocitomas anaplásicos son tumores neuroepiteliales, que se definen según la OMS como astrocitomas difusamente infiltrativos, malignos y que presentan anaplasia focal o dispersa.

Se pueden originar a partir de un astrocitoma de bajo grado, aunque no resulta infrecuente en la práctica clínica diaria hacer el diagnóstico de astrocitomas anaplásicos en primera instancia sin evidencia de que el paciente haya presentado previamente un tumor precursor de bajo grado. Como todos los gliomas anaplásicos, presentan una tendencia intrínseca a la progresión hacia GB.

Se consideran lesiones grado III en la clasificación de la OMS y corresponden al código morfológico 9401/3 de la *"Internacional Classification of Diseases for Oncology"* (ICD-O) y

de la *"Systematized Nomenclature of Medicine"* (SNOMED), siendo el /3 el código correspondiente a tumores malignos (Kleihues et al., 2007).

La incidencia de astrocitomas anaplásicos ajustada por edad a la población norteamericana del año 2000 fue de 0.40 (0.39-0.42)/100.000 habitantes-año, 0.47 (0.45-0.50)/100.000 habitantes-año para varones y de 0.34 (0.32-0.37)/100.000 habitantes-año para mujeres.

La incidencia fue mayor en pacientes de raza blanca 0.44 (0.42-0.46)/100.000 habitantes-año, que en pacientes de raza negra 0.19 (0.16-0.23)/100.000 habitantes-año (CBTRUS 2007-2008, 2009).

La edad de presentación de estos tumores es algo mayor que la de los pacientes con astrocitomas de bajo grado y algo inferior que la de pacientes con glioblastoma, siendo la tercera y cuarta décadas de la vida aquellas en las que se describe mayor incidencia de este tipo de lesiones (Cavenee et al., 2000; DeAngelis, 2001; Perry et al., 1999; Tortosa et al., 2003).

Del mismo modo que los astrocitomas de bajo grado, los astrocitomas anaplásicos pueden originarse en cualquier zona del SNC. No obstante, la localización más frecuente es la supratentorial, es decir se originan fundamentalmente en los hemisferios cerebrales y principalmente en los lóbulos frontal y temporal.

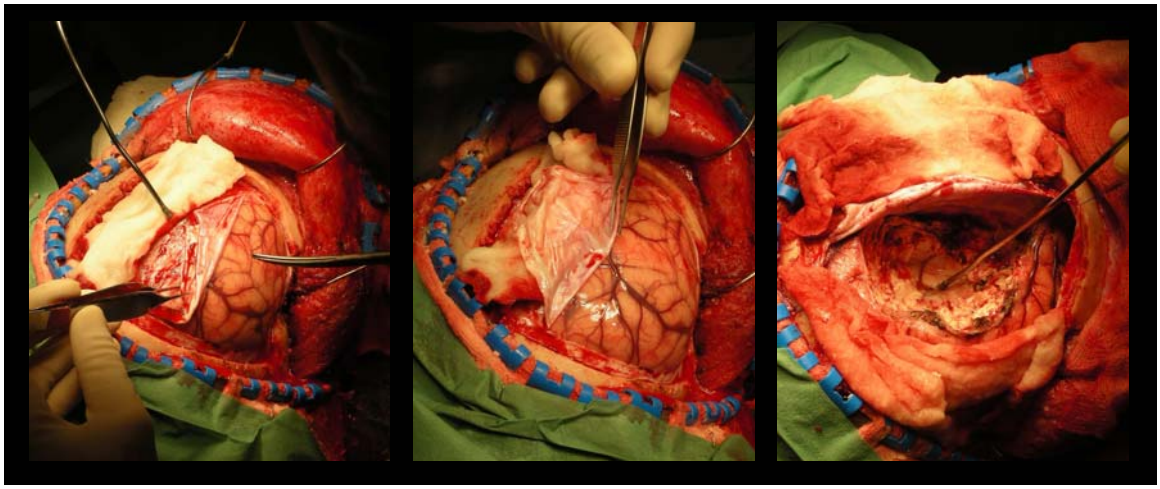
La presentación clínica en forma de crisis comiciales es habitual, si bien en la anamnesis del paciente no es infrecuente detectar que algún déficit neurológico sutil precedió a las crisis pero pasó desapercibido. El intervalo de tiempo que transcurre desde el primer síntoma hasta el diagnóstico suele ser de pocos meses. Es también frecuente la presentación en forma de empeoramiento de una focalidad neurológica previa, de reaparición o agravamiento de crisis comiciales o de instauración de signos y síntomas de hipertensión intracraneal en un paciente previamente diagnosticado de astrocitoma de bajo grado.

Desde el punto de vista de neuroimagen, los astrocitomas anaplásicos se muestran como lesiones heterogéneas en la TC sin contraste. Es infrecuente la presencia de calcificaciones intratumorales excepto en aquellos casos de transformación maligna de un astrocitoma de bajo grado previo. Pueden presentar focos de hemorragia en su interior. En la RM aparecen como lesiones heterogéneas, de límites mal definidos y con áreas de alta y baja intensidad tanto en secuencias potenciadas en T1 como en T2. Su carácter infiltrativo ocasiona que incluso lesiones de gran tamaño no ejerzan un efecto de masa significativo sobre las estructuras cerebrales adyacentes. Tras la administración de contraste pueden presentar cualquier tipo de patrón de captación de contraste, sólida, anular, e incluso no captar contraste (Ginsberg et al., 1998; Scott et al., 2002). Suelen rodearse de edema peritumoral (Osborn, 1994).

El estándar de oro para el diagnóstico de estas lesiones continúa siendo en la actualidad el estudio histológico del tejido ya que, aunque en la última década numerosos grupos de investigación han dirigido sus esfuerzos hacia el desarrollo de tecnología que permita hacer un diagnóstico preciso por imagen basándose en el estudio del flujo sanguíneo cerebral por RM, del perfil espectroscópico por RM o en el depósito de determinados radiotrazadores isotópicos en el PET cerebral, estas técnicas de neuroimagen no permiten hasta la fecha, una distinción precisa entre los gliomas de grado III (gliomas anaplásicos) y los de grado IV (glioblastoma) (Cao et al., 2006; Stadlbauer et al., 2006; Torii et al., 2005), y por tanto, hoy por hoy no sustituyen en absoluto al diagnóstico histológico.

Macroscópicamente, los astrocitomas anaplásicos son lesiones de límites mal definidos, y que en ocasiones sólo producen un ensanchamiento y aplanamiento de las circunvoluciones cerebrales que infiltran, o un aumento de la consistencia de las mismas respecto al parénquima sano (Figura 2.)

Figura 2. Imágenes intraoperatorias de un astrocitoma anaplásico



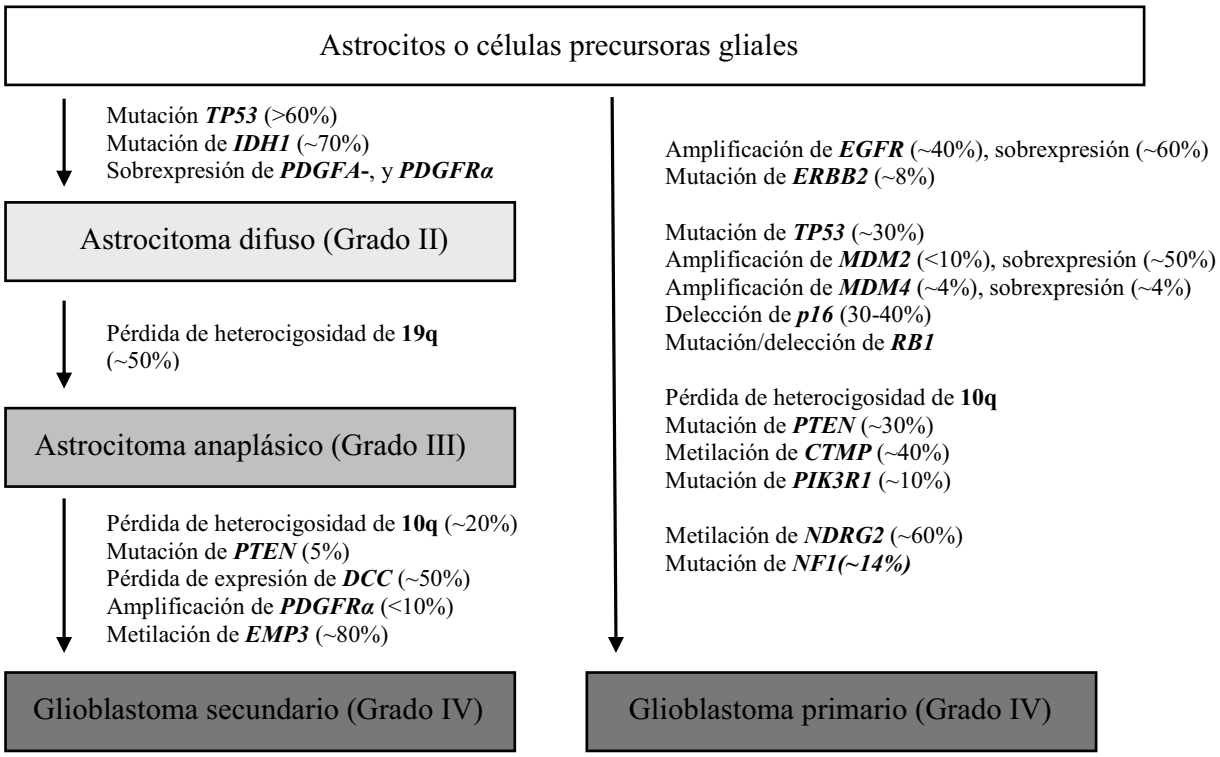
Desde el punto de vista histopatológico se componen de astrocitos neoplásicos bien diferenciados sobre una matriz poco estructurada y en ocasiones microquística. La celularidad aumentada, la presencia de atipia nuclear y de marcada actividad mitótica los caracterizan y distinguen de los gliomas de bajo grado, mientras que la presencia de glomérulos microvasculares y focos de necrosis, característicos del glioblastoma son incompatibles con el diagnostico de astrocitoma anaplásico.

Es típica la inmunoreactividad para GFAP, proteína S-100, vimentina y αβ-cristalina. La expresión de VEGF suele estar limitada a algunos vasos tumorales. La fracción de crecimiento, o índice de proliferación celular, determinado mediante inmunohistoquímica con anticuerpos para Ki-67/MIB-1 suele oscilar entre 5 y 10% (Kleihues et al., 2007).

2.1.1 GENETICA MOLECULAR

Dado que los astrocitomas anaplásicos representan desde un punto de vista clínico, morfológico y genético un estadio intermedio en la progresión del astrocitoma de bajo grado a glioblastoma, presentan las alteraciones genéticas características de los astrocitomas de bajo grado (mutaciones de *TP53* o LOH*17p*) y algunas propias de los glioblastomas (LOH*10q*, mutación de *PTEN* etc.) tal como puede observarse en la Figura 3.

Figura 3. Alteraciones genéticas y secuencia de aparición en el tiempo Modificado de Riemenschneider et al. (Riemenschneider y Reifenberger, 2009)



Además de las alteraciones expuestas en la Figura 3., los astrocitomas anaplásicos pueden mostrar alteraciones en los cromosomas *7p* (hasta un 11%) (Miwa et al., 2009), *6q* (30-75%) (Ichimura et al., 2006), *9p* (hasta un 39%) (Dehais et al., 2006), *11p* (hasta un 30%) (Smith y Jenkins, 2000), *19q* (hasta un 46%) (Huang et al., 2009) y *22q* (entre el 20-30%) (Smith y Jenkins, 2000). Así mismo presentan mutaciones de *IDH1* con una frecuencia similar a la de los astrocitomas difusos (Yan et al., 2009).

2.2. OLIGODENDROGLIOMAS ANAPLÁSICOS

Los tumores oligodendrogliales constituyen en general entre el 25 y el 33% de todos los gliomas (Daumas-Duport et al., 1997; Kapoor et al., 2009). Los oligodendrogliomas anaplásicos son tumores difusamente infiltrativos compuestos fundamentalmente por células que morfológicamente se asemejan a la oligodendroglía. Presentan además características histológicas de malignidad focales o difusas, se consideran lesiones grado III de la OMS y corresponden al código 9451/3 de la*"Internacional Classification of Diseases for Oncology"* (ICD-O) y de la *"Systematized Nomenclature of Medicine"* (SNOMED) (Reifenberger et al., 2007).

La incidencia ajustada por edad en la población norteamericana del año 2000 fue de 0.12 (0.12-0.13)/100.000 habitantes-año; 0.14 (0.12-0.15)/100.000 habitantes-año para varones y de 0.11 (0.10-0.13)/100.000 habitantes-año para mujeres.

Una vez más la incidencia fue significativamente mayor en el grupo de población de raza blanca: 0.14 (0.13-0.15)/100.000 habitantes-año frente a 0.04 (0.03-0.06)/100.000 habitantes-año en la población negra (CBTRUS 2007-2008, 2009), si bien otros autores sostienen que la incidencia es similar en blancos, afroamericanos o hispanos.

Existe conocimiento de asociación familiar, aunque extremadamente infrecuente (Jaeckle et al., 2006).

Se manifiestan fundamentalmente en adultos, con un pico de máxima incidencia a los 45-50 años y se acepta que existe, tal como expresan las estadísticas norteamericanas, una discreta predominancia en varones (1.5:1) (CBTRUS 2007-2008, 2009; Ohgaki y Kleihues, 2005).

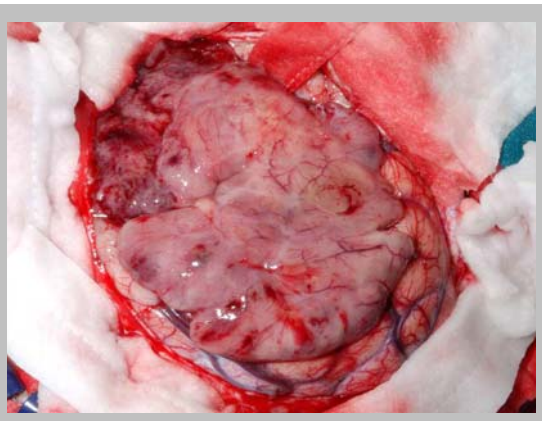
Los oligodendrogliomas anaplásicos afectan al córtex y a la sustancia blanca principalmente de los hemisferios cerebrales, aunque se han descrito casos en la práctica

totalidad del SNC. El lóbulo frontal es el lugar de localización más frecuente, seguido del lóbulo temporal (Smith y Jenkins, 2000).

La presentación clínica es indistinguible de la de otros gliomas anaplásicos, y del mismo modo que en el caso de los astrocitomas anaplásicos, la existencia de sintomatología de larga evolución previa al diagnóstico, sugiere la preexistencia de un oligodendroglioma de bajo grado en el paciente, si bien pueden también aparecer *de novo* (Reifenberger et al., 2007). No obstante, la presentación clínica en forma de crisis comiciales es más frecuente que en otro tipo de gliomas (Buccoliero et al., 2005). Otros síntomas frecuentes son la cefalea, el deterioro cognitivo, o cualquier tipo de focalidad neurológica variable en función del área de asentamiento de la masa tumoral.

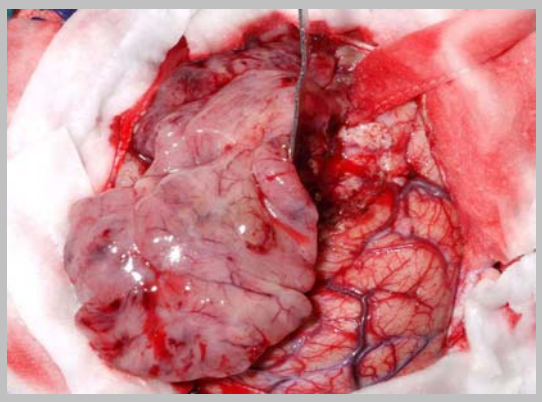
En lo concerniente al diagnostico por imagen, cabe destacar que en general, los oligodendrogliomas son los tumores intracraneales que con mayor frecuencia muestran calcificaciones. En la TC sin contraste se muestran típicamente como lesiones heterogéneas, parcialmente calcificadas, con degeneración quística, necrosis, o hemorragia intratumoral en grado variable. En la RM presentan señal mixta, hipo o isointensa con el parénquima cerebral circundante en secuencias potenciadas en T1; en T2 muestran áreas de hiperintensidad. Tras la administración de contraste tanto en TC como en RM suelen presentar un realce homogéneo o parcheado, si bien en algunos casos puede aparecer captación anular (Osborn, 1994; Reifenberger et al., 2000). Globamente presentan realce de algún tipo tras la administración de contraste más de 80% de los oligodendrogliomas anaplásicos, a diferencia de los de bajo grado que sólo presentan captación de contraste en menos del 10% de los pacientes (Jaeckle et al., 2006).

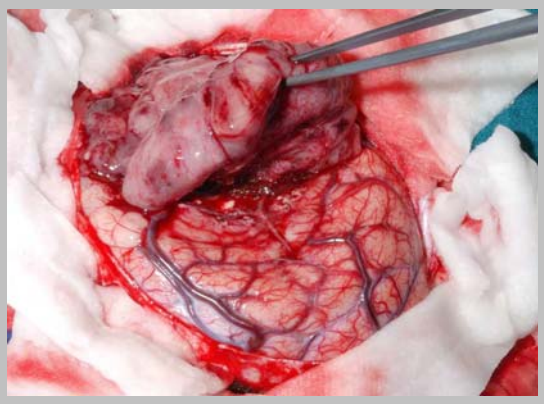
Figura 4. Aspecto macroscópico de un oligodendroglioma anaplásico



Macroscópicamente suelen presentar límites bien definidos en algunas zonas, junto con otras áreas más infiltrativas. El tumor suele mostrar un aspecto gris-rosado. Pueden infiltrar las leptomeníngeas adyacentes y presentar áreas de necrosis.

Las áreas de calcificación suelen encontrarse en la periferia.





Desde el punto de vista histopatológico se definen como oligodendrogliomas con características histológicas de malignidad de forma difusa o focal. Así, presentan celularidad aumentada, atipia marcada, y alta actividad mitótica. Pueden incluso mostrar proliferación microvascular y necrosis. Sus células en la mayoría de los casos son desde el punto de vista morfológico reminiscencia de las células oligodendrogliales es decir, con núcleos redondos e hipercromáticos, halo perinuclear y escasos procesos celulares. Sin embargo algunos casos pueden presentar un pleomorfismo marcado con células multinucleadas gigantes, células en huso, oligodendrocitos gliofibrilares o minigemistocitos. Ninguna de estas características ha mostrado influencia pronóstica, de igual manera que la presencia de proliferación microvascular o necrosis en ellos no determina, a diferencia de lo que sucede en los astrocitomas, una mayor agresividad (Reifenberger et al., 2007).

No existe hasta la fecha ningún marcador inmunohistoquímico específico de tumor oligodendroglial.

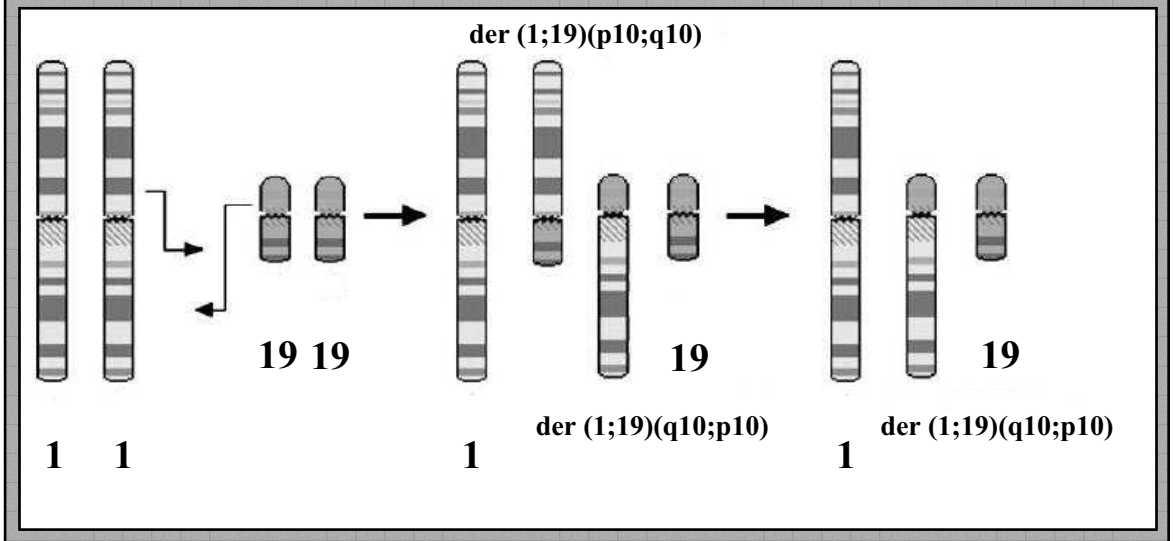
Del mismo modo que los tumores astrocitarios muestran inmunorreactividad positiva para proteína S-100, gamma-enolasa, GFAP o vimentina.

2.2.1 GENETICA MOLECULAR

La principal característica genética de los tumores oligodendrogliales es la presencia de deleción, denominada también pérdida de heterocigosidad, de *1p19q* (LOH*1p19q*). Dicha alteración parece deberse a una traslocación no balanceada entre los cromosomas 1 y 19: t(1;19)(q10;p10), centromérica o pericentromérica (Weller et al., 2007) (Figura 5.).

Los genes supresores eventualmente responsables de la génesis tumoral y situados en dichos cromosomas no son todavía conocidos. A su vez LOH*1p* se asocia a LOH*19q*.

Figura 5. Traslocación 1p;19q. Modificado de Griffin et al. (Griffin et al., 2006)



Propuesta para el mecanismo de traslocación *1p19q* en oligodendrogliomas. Una copia de cada uno de los cromosomas 1 y 19 sufre un proceso de intercambio recíproco de sus respectivos brazos largos a nivel del centrómero. Se originarían de este modo dos cromosomas derivativos: der(1;19)(p10;q10) y der(1;19)(q10;p10) tal como se muestra en el esquema.

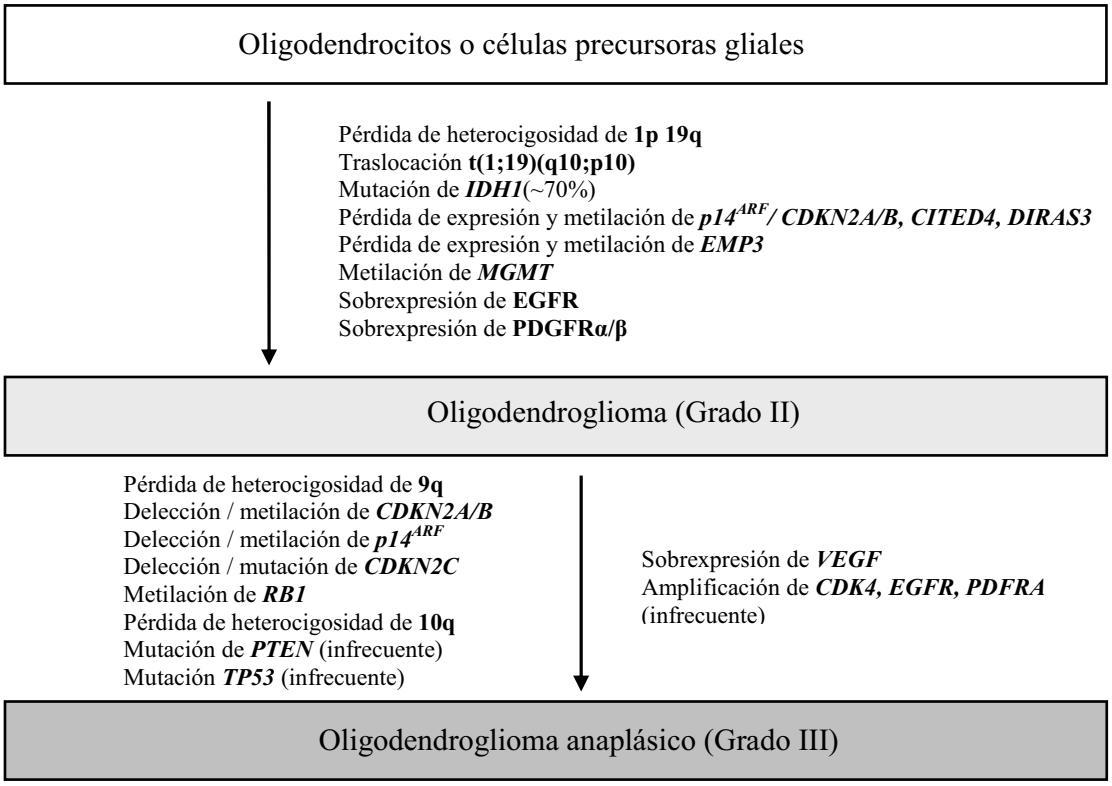
El cromosoma derivativo que contiene el brazo corto del cromosoma 1 y el brazo largo del cromosoma 19 se pierde a continuación, permaneciendo el otro cromosoma derivativo

En general y en la población adulta, se observa LOH*1p19q* en el 63-74% de los oligodendrogliomas anaplásicos y en el 34-52% de los oligoastrocitomas anaplásicos (Cairncross et al., 1998; Ino et al., 2001).

En los oligodendrogliomas de bajo grado parece ser más frecuente aún que en los anaplásicos, describiéndose hasta en el 80-90% de los casos en algunos trabajos, si bien existe cierta controversia al respecto. En la población infantil, sin embargo, estas deleciones no parecen ser tan frecuentes (Aldape et al., 2007; Jaeckle et al., 2006; McDonald et al., 2005; Reifenberger et al., 1994; Walker et al., 2004). La fuerte asociación de ambas deleciones sugiere un efecto sinérgico que conferiría una ventaja en el crecimiento de manera selectiva a las células oligodendrogliales (Reifenberger y Louis, 2003).

Pueden también presentar mutaciones de *IDH1* hasta en un 70% de los casos (Riemenschneider y Reifenberger, 2009), así como alteraciones en los cromosomas *9* y *10q* (en el 21-55%) (Kapoor et al., 2009; Kuo et al., 2009). Las mutaciones de *PTEN* y las deleciones de *10q* suelen estar presentes en alrededor de 19-25% de los casos, y generalmente en aquellos tumores que no presentan LOH*1p19q* de modo que ambas alteraciones parecen ser mutuamente excluyentes (Aldape et al., 2007; van den Bent et al., 2008). La pérdida parcial o completa de *10q* se ha asociado con un comportamiento agresivo y con mal pronóstico en pacientes con oligodendrogliomas, independientemente de la quimiosensibilidad de los mismos (Lavon et al., 2007).

Figura 6. Alteraciones genéticas y secuencia de aparición en el tiempo Modificado de Riemenschneider et al. (Riemenschneider y Reifenberger, 2009)



2.3. OLIGOASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS

El diagnóstico de oligoastrocitoma anaplásico es difícil y controvertido (Kleihues et al., 2002). Para que un tumor sea clasificado como tal se requiere del reconocimiento en el mismo de dos poblaciones celulares que inequívocamente deben ser neoplásicas: la astrocitaria y la oligodendroglial. Además, el tumor debe presentar características histológicas de malignidad como celularidad aumentada, atipia nuclear, pleomorfismo y actividad mitótica elevada.

Son consideradas lesiones grado III de la OMS y su código provisional de la *"Internacional Classification of Diseases for Oncology"* (ICD-O) y de la *"Systematized Nomenclature of Medicine"* (SNOMED) es 9832/32 (von Deimling et al., 2007).

No existen datos epidemiológicos específicos de incidencia de oligoastrocitomas anaplásicos. En el estudio CBTRUS se halló una incidencia ajustada para gliomas mixtos de

0.17 (0.16-0.18)/100.000 habitantes-año, no especificando qué proporción de ellos fueron anaplásicos (CBTRUS 2007-2008, 2009). De hecho, debido a la laxitud de criterios a la hora de definir un tumor como oligoastrocitoma, la incidencia de este subgrupo histológico varía de manera sustancial entre los diversos estudios y de institución a institución (Mueller et al., 2002).

La edad de presentación, la localización, la presentación clínica, y el aspecto radiológico o macroscópico, no son específicos de esta entidad tumoral presentando habitualmente características propias del astrocitoma anaplásico y del oligodendroglioma anaplásico.

Desde el punto de vista histopatológico puede dividirse en variedad "bifásica" o "compacta", en que las áreas de componente oligodendroglial y astrocitario están yuxtapuestas y claramente definidas, o variedad "entremezclada" o "difusa" en la que ambos componentes se funden sin que exista una frontera clara entre ellos. La proporción necesaria de ambas poblaciones tumorales para llegar al diagnóstico de oligoastrocitoma es un tema debatido en la literatura. Mientras que algunos autores consideran un tumor como oligoastrocitario si posee una proporción de células atrocitarias igual o superior al 10% (Krouwer et al., 1997), la EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer)* y la RTOG (*Radiation Therapy Oncology Group)* definieron como oligoastrocitomas aquellos tumores astrocitarios que contuvieran una proporción igual o superior al 25% de celularidad oligodendroglial (van den Bent, 2000). Los signos histológicos de malignidad pueden estar presentes en el componente oligodendroglial, en el astrocitario o en ambos (von Deimling et al., 2007).

2.3.1 GENÉTICA MOLECULAR

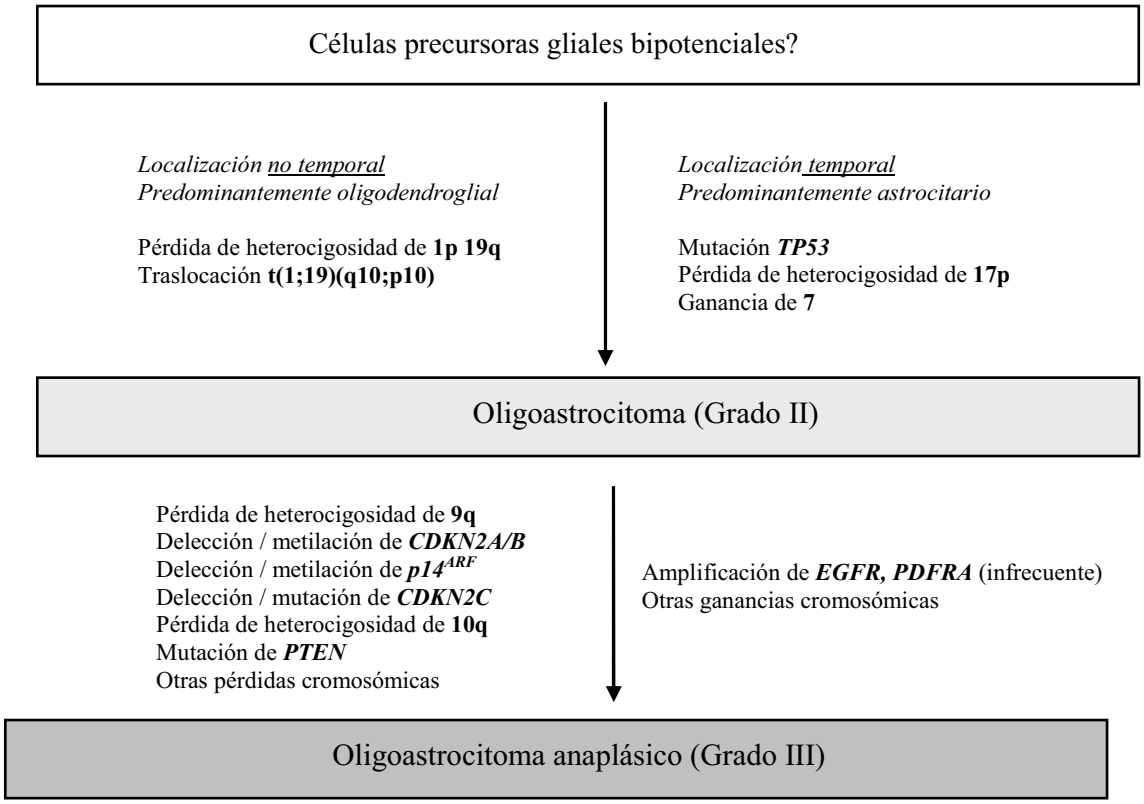
No se conocen alteraciones genéticas específicas que distingan los oligoastrocitomas anaplásicos de los oligodendrogliomas anaplásicos o de los astrocitomas anaplásicos, siendo las alteraciones genéticas y cromosómicas en los gliomas mixtos muy heterogéneas (Reifenberger y Louis, 2003). Mientras que en algunos estudios las alteraciones genéticas en la parte oligodendroglial y astrocitaria del tumor han mostrado ser idénticas, indicando un origen monoclonal del oligoastrocitoma, otros trabajos publicados han demostrado la existencia de heterogeneidad en las alteraciones genéticas observadas en la parte astrocitaria u oligodendroglial de la lesión (Kraus et al., 1995; Qu et al., 2007; Riemenschneider y Reifenberger, 2009).

Aproximadamente un 30% de los oligoastrocitomas presentan alteraciones genéticas típicas de los astrocitomas difusos, esto es, mutaciones de *TP53* y *17p* y ausencia de LOH*1p19q* (Mueller et al., 2002; Reifenberger et al., 1994; Walker et al., 2006).

Por el contrario el 50-70% de los oligoastrocitomas presentan alteraciones moleculares típicas de los oligodendrogliomas, esto es, presencia de LOH*1p* (Reifenberger et al., 1994; Ueki et al., 2002) de modo que aquellos que presentan deleción de *1p* también presentan LOH*19q* (Smith y Jenkins, 2000). Del mismo modo que en los oligodendrogliomas puros, la pérdida de heterocigosidad de *1p19q* presente en el 50-70% de los oligoastrocitomas, lo está con independencia del grado histológico, lo que sugiere que esta alteración genética es un evento precoz en el desarrollo de las neoplasia (Kraus et al., 1995; Reifenberger et al., 1994; Smith y Jenkins, 2000; Ueki et al., 2002).

Es importante tener presente que dadas las diferencias en los criterios de diagnóstico de oligoastrocitoma, la comparación de series y resultados procedentes de instituciones distintas puede no ser adecuada, siendo en ocasiones las eventuales diferencias encontradas más atribuibles en realidad a la variabilidad diagnóstica, que a diferencias biológicas reales (Reifenberger y Louis, 2003).

Figura 7. Alteraciones genéticas y secuencia de aparición en el tiempo Modificado de Riemenschneider et al. (Riemenschneider y Reifenberger, 2009)



3. TRATAMIENTO ACTUAL

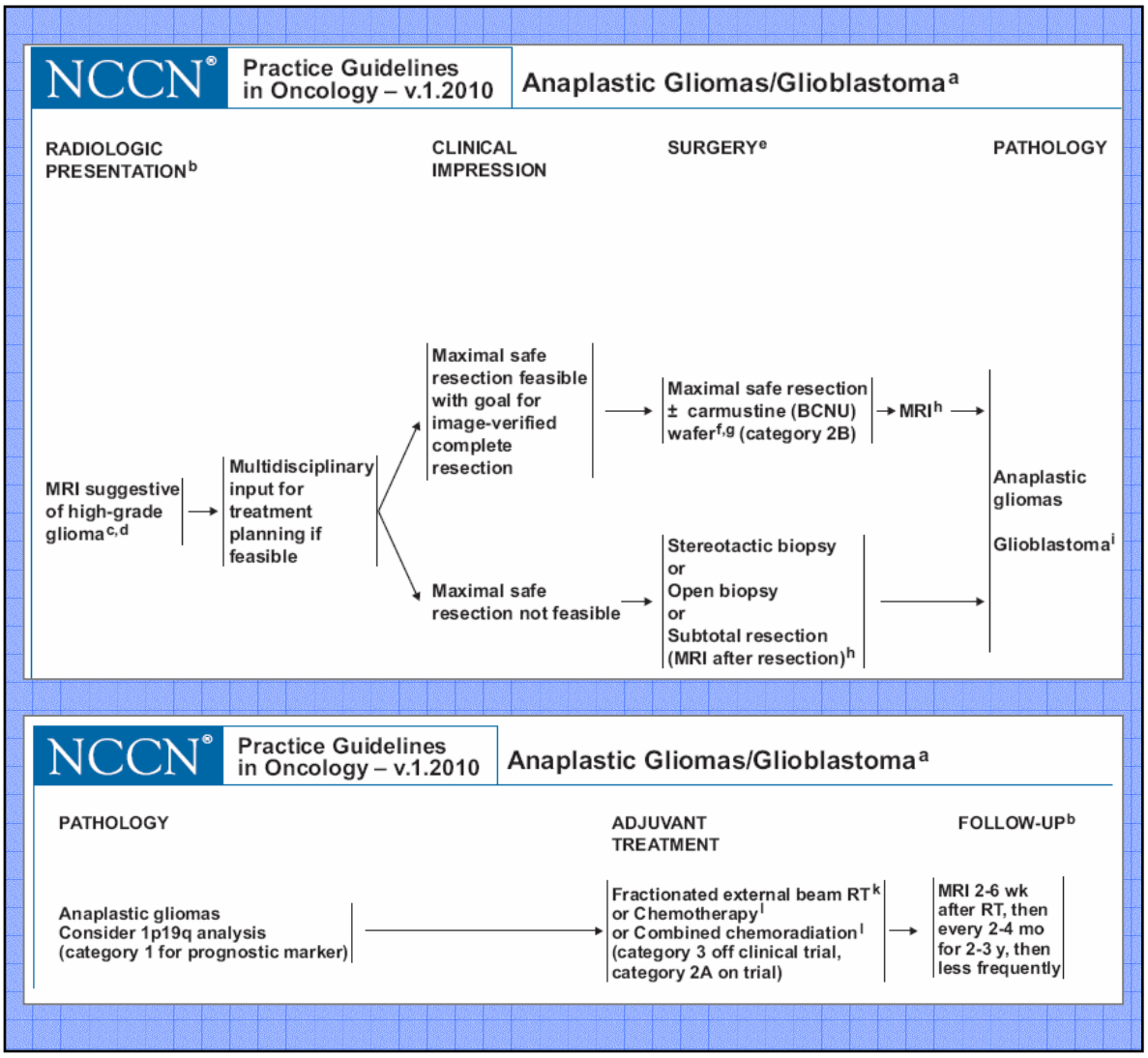
Después de varias décadas sin cambios significativos en la supervivencia de los gliomas malignos, asistimos en el último lustro a una tendencia firme hacia un aumento de supervivencia en estos pacientes.

Ello es probablemente debido, en opinión de los expertos, a diversos avances en los estándares de tratamiento de los últimos años, de modo que nos encontramos en la actualidad en un momento de cierto optimismo (Van Meir et al., 2010).

Como será expuesto en el apartado siguiente, los factores pronósticos clínicos clásicos como la edad y el estado funcional continúan demostrando un valor pronóstico decisivo, de manera que en este sentido, los avances terapéuticos no parecen haber aportado demasiado, no siendo capaces todavía de modificar la historia natural de la enfermedad. Sin embargo, existe un subgrupo seleccionado de pacientes en el que los avances terapéuticos están mostrando sus frutos, y por ello resulta cada vez más frecuente el observar curvas de supervivencia con medianas que superan los datos clásicos.

En conjunto, el estándar terapéutico para los gliomas malignos continúa siendo en la actualidad multidisciplinar y basado en cirugía, radioterapia y quimioterapia. Las Guías de Práctica Clínica en Oncología de la "*National Comprehensive Cancer Network" ("NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology")*, en su última actualización de 2010 recomiendan como norma general que los pacientes con tumores cerebrales sean referidos a profesionales con experiencia en el manejo y diagnóstico de estos (www.nccn.org). El algoritmo de estas guías para los pacientes con gliomas anaplásicos se expone en la Figura 8.:

Figura 8. Algoritmo terapéutico para gliomas anaplásicos (www.nccn.org)



This pathway includes the classification of mixed anaplastic oligoastrocytoma (AOA), anaplastic astrocytoma (AA), anaplastic oligodendroglioma (AO), and other rare anaplastic gliomas. NCCN Categories of Evidence and Consensus: Category1 - There is uniform NCCN consensus, based on high-level evidence, that the recommendation is appropriate. Category 2A - There is uniform NCCN consensus, based on lower level evidence including clinical experience, that the recommendation is appropriate. Category 2B - There is non uniform NCCN consensus (but no major disagreement), based on lower-level evidence including clinical experience, that the recommendation is appropriate. Category 3 - There is major NCCN disagreement that the recommendation is appropriate. All recommendations are category 2A unless otherwise noted.

El tratamiento debe basarse, tal como puede observarse en el esquema en la máxima resección segura, debiéndose confirmar el grado de exéresis mediante una prueba de imagen. La

aplicación de quimioterapia local con obleas de carmustina (Gliadel®) es recomendado con un grado de evidencia 2B.

En cuanto al tratamiento complementario, se considera como estándar la radioterapia postoperatoria (Stupp et al., 2006), si bien por analogía con el glioblastoma se acepta el tratamiento con radioterapia y quimioterapia (temozolamida), aunque se acepta para esta recomendación un nivel de evidencia 2A en el seno de ensayos clínicos y 3 fuera de éstos.

El conjunto de variables que probablemente hayan influido en el incremento de la supervivencia de los pacientes con glioma maligno son por una parte las nuevas herramientas en radioterapia, que permiten una mejor conformación de los campos de irradiación y un ajuste al máximo de las dosis optimizando de este modo la eficacia con mínima toxicidad. Por otro lado la quimioterapia con temozolamida ha supuesto una importante mejoría en lo referente a eficacia, perfil de toxicidad y comodidad para el paciente. En cuanto a la cirugía, determinados avances acontecidos en los últimos años han supuesto también un incremento de la eficacia y sobre todo de la seguridad para los pacientes de los procedimientos neuroquirúrgicos.

En el siguiente apartado se exponen los principales aspectos relacionados con el tratamiento quirúrgico de los gliomas anaplásicos.

3.1. CONSIDERACIONES SOBRE EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LOS GLIOMAS ANAPLÁSICOS

Los gliomas anaplásicos constituyen, tal como se ha expuesto previamente, un grupo heterogéneo de lesiones con comportamiento biológico diverso, sin embargo, en todos ellos el neurocirujano posee un papel relevante. En los últimos tiempos, y debido fundamentalmente al avance en el conocimiento de la biología molecular de algunos tumores y de la terapéutica del cáncer en general, a los procedimientos quirúrgicos clásicos con fines diagnósticos o exeréticos, se ha sumado un resurgir de las terapias locales. Ello ha supuesto un fuerte nexo de unión entre neurocirujanos, oncólogos médicos, oncólogos radioterapeutas y demás especialistas implicados.

Por otra parte, el desarrollo de sofisticadas técnicas de neuroimagen y su aplicabilidad práctica en el diseño de la estrategia quirúrgica o durante el propio acto quirúrgico, han reforzado la relación entre neurocirujanos y radiólogos. Por todo ello, los equipos multidisciplinarios son en la actualidad el pilar fundamental sobre el que se sostiene el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con tumores del sistema nervioso central, debiendo

entenderse la cirugía como una parte complementaria de las otras disciplinas y éstas, así mismo, como complementos de la cirugía.

La cirugía debe contribuir en primer lugar a un diagnóstico preciso. Las nuevas técnicas de neuroimagen basadas en el estudio del flujo sanguíneo cerebral por RM, espectroscopia o PET, han supuesto un gran avance en la presunción diagnóstica de los tumores cerebrales. Sin embargo, el estudio anatomopatológico de la lesión continúa siendo en la actualidad el estándar diagnóstico. De ello depende no sólo el tratamiento del paciente, sino que la obtención de material suficiente para la caracterización molecular de las lesiones (Brell et al., 2005; McLendon et al., 2005).

En aquellos tumores no tributarios de resección quirúrgica, la obtención de muestra para diagnóstico puede efectuarse mediante técnicas de estereotaxia clásica, estereotaxia sin marco guiada por neuronavegación, endoscopia o cirugía a cielo abierto. En este caso, el problema de las discrepancias diagnósticas puede verse agravado debido al menor tamaño de la muestra, habiéndose descrito discrepancias entre el diagnóstico obtenido por biopsia y por resección en más de un tercio de los casos (Jackson et al., 2001). Por otro lado, la heterogeneidad característica de los gliomas supone que en el seno del mismo tumor puedan coexistir áreas con diferente grado histológico. Por ello, el neurocirujano consciente de este problema, procura seleccionar varias dianas de biopsia en el intento de mejorar la representatividad de la misma. Desgraciadamente la selección de las áreas a biopsiar se efectúa, aún hoy en día, en la mayoría de los centros de nuestro entorno, basándose en la presencia o no de captación de contraste. No obstante, es bien conocido que entre el 9 y el 30% (según las series) de los gliomas no captantes de gadolinio son de alto grado, que alrededor del 20% de los gliomas de bajo grado captan contraste y que incluso un 4-5% de los GB no captan (Ginsberg et al., 1998; Scott et al., 2002). El desarrollo de nuevas técnicas de neuroimagen y la universalización de las mismas permitirá una selección guiada de las dianas disminuyendo así las probabilidades de “infradiagnosticar” la lesión (Roessler et al., 2007).

Pero además, la cirugía de los tumores del sistema nervioso tiene como objetivo prioritario el alivio sintomático del paciente y con ello una mejora en su calidad de vida. En situaciones con masas tumorales de gran volumen que producen hipertensión intracraneal o compresión medular severa el tratamiento quirúrgico es prioritario y debe realizarse lo antes posible. El desplazamiento de la línea media, es un hecho frecuente en los pacientes afectos de tumores cerebrales habiéndose determinado su existencia hasta en un 74% de los casos en algunas series; el tratamiento con terapias adyuvantes es casi imposible si previamente no se efectúa una disminución del efecto de masa y de la presión intracraneal. La focalidad

neurológica del paciente puede mejorar tras la intervención quirúrgica al disminuir el efecto de masa que sobre las estructuras nerviosas adyacentes ejerce el tumor (Whittle et al., 1998), e inclusive algunas series de la literatura relacionan una mayor tasa de complicaciones quirúrgicas y secuelas neurológicas tras las resecciones parciales (Brell et al., 2000; Sawaya et al., 1998).

Es importante destacar que independientemente del subtipo histológico, en aproximadamente un 7% de los gliomas que asientan sobre áreas elocuentes, existe función neurológica preservada en el seno del tumor (Sawaya et al., 1998; Sawaya, 1999).

En estos tumores las técnicas de RM funcional, la tractografía, la magnetoencefalografía, etc., son de vital importancia en el diseño de la estrategia quirúrgica y la neuronavegación, las técnicas de imagen intraoperatoria y sobre todo la estimulación cortical intraoperatoria, herramientas imprescindibles para el neurocirujano.

Debido a que el estado funcional del paciente condicionará el tratamiento complementario radio y quimioterápico a seguir, la cirugía debe perseguir como objetivo que el máximo número posible de pacientes sean tributarios de estas terapias, inclusive aquellos que preoperatoriamente no lo serían.

La extirpación de un tumor cerebral supone además en muchas ocasiones la erradicación de un foco epileptógeno librando en algunos casos al paciente de la necesidad de tratamiento farmacológico y disminuyendo el riesgo potencial de comicialidad refractaria (Glantz et al., 2000; van Breemen et al., 2007).

A su vez, el tratamiento quirúrgico permite en muchas ocasiones disminuir de forma significativa o incluso suspender la dosis de corticoides de los pacientes. Esto posee una importancia vital en la calidad de vida de éstos, ya que desgraciadamente en ocasiones desarrollan efectos secundarios severos tras tratamientos prolongados. Los corticoides interaccionan, además con algunos fármacos anticomiciales, dificultan la interpretación de las pruebas de neuroimagen en el seguimiento evolutivo de los pacientes y, lo que es más importante, algunos estudios señalan que pueden disminuir la eficacia del tratamiento quimioterápico por inducir en el tumor expresión de MGMT (Ueda et al., 2004; Weller et al., 1997).

Por último destacaremos que la cirugía disminuye el “pool” de células neoplásicas favoreciendo la actuación de las terapias complementarias. De hecho, cada vez se concede mayor importancia al volumen de tumor residual tras la intervención (Lacroix et al., 2001) frente al volumen de tumor extirpado. Los ensayos clínicos multicéntricos más recientes sobre tratamiento radio-quimioterápico en gliomas confirman una mayor respuesta al tratamiento en el grupo de pacientes sometidos a resecciones completas (Gorlia et al., 2008; Stupp et al., 2007).

Desde un punto de vista patogenético los gliomas son una enfermedad clonal en la que la acumulación de determinadas alteraciones genéticas origina la aparición de una primera célula neoplásica y a partir ésta se origina el tumor. Durante el crecimiento y progresión del mismo van sumándose nuevas alteraciones moleculares produciéndose la heterogeneidad genotípica y fenotípica característica de los gliomas, y una evolución hacia formas biológicamente más agresivas. Por ello, al menos en un plano teórico, debería existir alguna fase incipiente del glioma en la que éste podría ser curable mediante exéresis quirúrgica. Desgraciadamente, la realidad de la práctica clínica diaria es que en el momento del diagnóstico de un glioma, las células tumorales infiltran el parénquima cerebral más allá de los límites definidos por la captación de contraste en la TC o RM, e incluso superan el área de hiperseñal peritumoral de las secuencias potenciadas en T2 de la RM. Se calcula que menos de un 50% del volumen real del tumor queda incluido en el área de realce de contraste que en realidad representa simplemente la disrupción de la barrera hematoencefálica.

De este modo, si asumimos que un glioma de alto grado contiene entre 10^{11} - 10^{12} células cuando es diagnosticado, una exéresis de un 90-99% (es decir de 1 a 2 log) del mismo supondría que entre un 10^{9} - 10^{10} células permanecen en el lecho de resección (Salcman et al., 1996). Sin embargo, la densidad de células malignas infiltrantes decrece con la distancia al centro de la masa tumoral y por ello a mayor radicalidad de la resección, menor población de células neoplásicas residual sobre las que deberán actuar las terapias complementarias (Mitchell et al., 2005).

Existen otras razones teóricas por las que las terapias complementarias incrementan su eficacia tras las resecciones completas y están sustentadas por trabajos experimentales: tras la cirugía se suceden en el parénquima cerebral cambios en el flujo sanguíneo y en el metabolismo, se eliminan células resistentes, se facilita la apertura de la barrera hematoencefálica y por tanto la capacidad de penetración de los agentes quimioterápicos, y se produce una redistribución de células quiescentes a un estado metabólico más activo por reducción de la población celular (Salcman et al., 1996).

En el último lustro, las nuevas técnicas de neuroimagen funcional y la estimulación cortical intraoperatoria han cambiado muchos de los convencionalismos sobre irresecabilidad de lesiones asentadas en las llamadas áreas elocuentes. El planteamiento clásico asumía una estructura cerebral de acuerdo a una organización funcional fija e idéntica en todos los individuos. Sin embargo hoy sabemos que existe una gran variabilidad interindividual de estas áreas y que algunos gliomas de crecimiento lento pueden provocar una remodelación funcional de las zonas que invaden, lo que podría explicar porqué a pesar de ser lesiones de crecimiento

infiltrativo, no producen focalidad neurológica en algunos pacientes (Tzourio-Mazoyer et al., 2004).

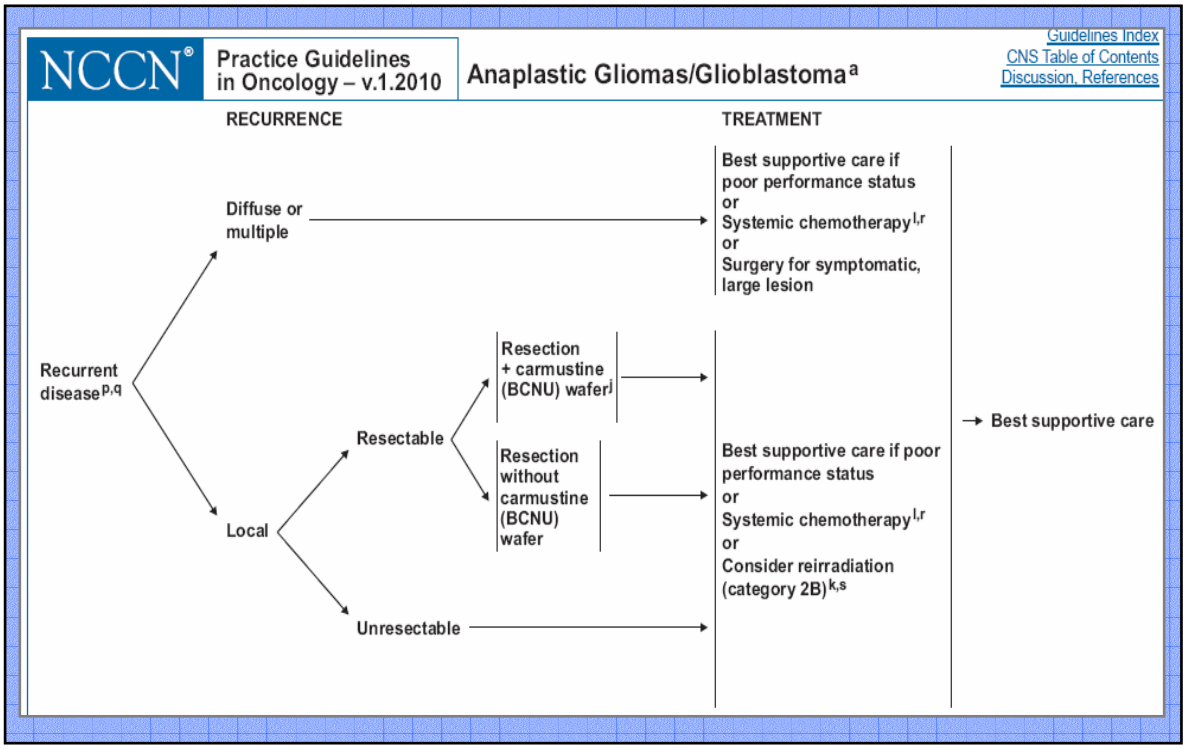
Por lo tanto, la organización funcional del cerebro no es estática sino que existe cierta plasticidad cerebral en el adulto. Los fundamentos neurobiológicos de esta plasticidad no son a día de hoy conocidos, del mismo modo que se desconocen los motivos por los que ésta se pone de manifiesto sólo en algunos pacientes (Duffau et al., 2002; Duffau, 2005). Entre los mecanismos que se barajan como implicados en la misma se especula con fenómenos de modulación en la eficacia sináptica (Byrne, 1997), aparición de conexiones latentes (circuitos redundantes) (Jacobs y Donoghue, 1991) o mecanismos de neurogénesis (Gross, 2000).

La recidiva o progresión de los tumores gliales tras el tratamiento es desgraciadamente una constante y por ello la necesidad de considerar un re-tratamiento una situación muy frecuente en la práctica clínica.

Si bien una vez más no existe evidencia clase I al respecto, las Guías de Práctica Clínica en Oncología de la NCCN incluyen la resección quirúrgica como primer paso, siempre que sea posible, en el tratamiento de los gliomas de alto grado en recidiva o progresión (Figura 9.):

Figura 9. Algoritmo terapéutico para gliomas anaplásicos en recidiva/progresión

(www.nccn.org)



This pathway includes the classification of mixed anaplastic oligoastrocytoma(AOA), anaplastic astrocytoma (AA), anaplastic oligodendroglioma (AO), and other rare anaplastic gliomas. NCCN Categories of Evidence and Consensus: Category1 - There is uniform NCCN consensus, based on high-level evidence, that the recommendation is appropriate. Category 2A - There is uniform NCCN consensus, based on lower level evidence including clinical experience, that the recommendation is appropriate. Category 2B - There is non uniform NCCN consensus (but no major disagreement), based on lower-level evidence including clinical experience, that the recommendation is appropriate. Category 3 - There is major NCCN disagreement that the recommendation is appropriate.
All recommendations are category 2A unless otherwise noted.

En los pacientes con diagnóstico de glioma grado III en recidiva o progresión, la obtención de una nueva muestra histológica permitirá además valorar el eventual viraje de la lesión hacia un grado histológico más agresivo, así como plantear la opción de efectuar algún tipo de terapia local.

En los últimos años asistimos a un resurgir de las terapias locales en el tratamiento de los gliomas. El fundamento sobre el que se sustentan todas ellas es por una parte el hecho de que obvian muchas de las limitaciones de los tratamientos convencionales, por ejemplo la toxicidad sistémica de la quimioterapia, la dificultad de penetración al neuroeje de algunos fármacos por la existencia de barrera hemato-encefálica o los efectos secundarios de la

radioterapia, y por otra parte, sobre el hecho de que la velocidad de replicación de las células en un glioma de alto grado es tan elevada, que un tratamiento cuyo efecto comience en el mismo momento de la intervención tendría teóricamente ventajas claras en términos de eficacia.

Esta modalidad terapéutica implica especialmente a los neurocirujanos puesto que requiere de la colocación de catéteres en el seno del tumor o en la cavidad del lecho quirúrgico, y la instilación de fármacos durante días. Los catéteres son implantados mediante procedimientos estereotácticos o tras la resección del tumor a cielo abierto. Los pacientes requieren de vigilancia y cuidados específicos por parte del neurocirujano y la tasa de complicaciones derivadas de los propios tratamientos o de la técnica de administración del fármaco no es desdeñable. Por el momento, excepto los implantes de carmustina, el resto se efectúan en la mayoría de los casos en el seno de ensayos clínicos y en pacientes en recidiva o progresión.

En la Tabla 2. se resumen de manera esquemática las principales modalidades de terapia local:

Tabla 2.: Principales tipos de terapia local para tratamiento de los gliomas de alto grado

Tipo	Sustancia	Fundamento	Resultados
Quimioterapia local Gliadel®	Polímero: poly (ácido carboxifenoxipropano/sebacico) anhydrido + carmustina (3.85%; 7.7mg/oblea)	Se alcanzan mayores concentraciones locales, liberación durante 2-3 semanas.	Demostrada su eficacia en estudio fase III para glioblastoma en primera línea y recurrencias
Radioterapia intracavitaria Gliasite®	Solución acuosa I 125 (dosis media 50Gy)	Menor toxicidad que la radioterapia convencional con dosis equivalentes	Poca toxicidad. Resultados sobre eficacia preliminares aunque positivos
Terapia vírica Cerepro®	Vectores virales y virus oncológicos	Toxicidad selectiva sobre las células neoplásicas	Poca toxicidad. Resultados sobre eficacia preliminares
Terapia con citotoxinas Transmid®	Transferrin- CRM107 (transferrina + toxina diftérica modificada genéticamente	Toxicidad selectiva sobre las células neoplásicas	Poca toxicidad. Resultados sobre eficacia preliminares
Inmunoterapia	Inmunoestimulantes, vacunas, anticuerpos específicos, citokinas, linfocitos tratados	Estimular la respuesta inmune frente a la neoplesia	Resultados dispares
Biorreactores	Endostatina	Liberación local y controlada del agente tóxico	Fase experimental
Stem cells	Células con capacidad de migración y "persecución" de células tumorales, manipuladas genéticamente para producir sustancias con actividad terapéutica		Fase experimental

4. VALORACIÓN PRONÓSTICA: UN PROBLEMA CLÍNICO

De todo el espectro de tumores gliales, los gliomas anaplásicos, y en especial los astrocitomas anaplásicos son los más enigmáticos debido a los criterios patológicos de diagnóstico, al comportamiento biológico incierto y a su curso clínico impredecible.

La supervivencia global y libre de enfermedad de los pacientes afectos varía desde algunos meses (similar a la de los pacientes con diagnóstico de glioblastoma) a varios años (similar a la de los pacientes con diagnóstico de glioma de bajo grado). Esto hace que en la actualidad, no exista para estos tumores una estrategia óptima y universalmente aceptada de tratamiento.

Al margen de la potencial heterogeneidad real, muchas de las diferencias y contradicciones reportadas en la literatura pueden atribuirse a problemas metodológicos (See y Gilbert, 2004). En primer lugar, existen pocos estudios realizados en series puras de gliomas anaplásicos, incluyendo la mayoría de las series pacientes con diagnóstico de glioblastoma, cuyo comportamiento y pronóstico son radicalmente distintos.

En segundo lugar, debido a que los gliomas son tumores histológicamente heterogéneos, los pequeños fragmentos obtenidos para diagnóstico mediante procedimientos estereotáxicos, pueden no ser representativos de la totalidad del tumor. Así Jackson et al. (Jackson et al., 2001) demuestran en una serie de pacientes sometidos a biopsia estereotáxica y posteriormente reintervenidos para exéresis en un plazo de 60 días desde la primera cirugía, un 38% de discordancias entre el diagnóstico histológico inicial y el de la pieza completa. Del mismo modo McGirt et al. (McGirt et al., 2003) describen disparidad de resultados en el 21% de los casos de una serie de 43 pacientes. Este dato, que de entrada puede parecer poco relevante, resulta fundamental si se analizan detalladamente las escasas series publicadas centradas exclusivamente en gliomas anaplásicos. Sorprendentemente en algunas de estas series, más del 40% de los diagnósticos histológicos fueron efectuados sobre muestras obtenidas mediante procedimientos estereotáxicos (Tabla 3.):

Tabla 3.: Series de gliomas anaplásicos

Serie / Autor / año	n	Biopsias (%)[1]
Long-Term Survival in Treated Anaplastic Astrocytomas Fischbach et al., 1991	149	38
Influence of an Oligodendroglial Component on the Survival of Patients with Anaplastic Astrocytomas: A Report of Radiation Therapy Oncology Group 83-02 Donahue et al., 1997	109	45
Clinicopathologic Study of 85 Similar Treated Patients with Anaplastic Astrocytic Tumors Perry et al., 1999	66	43
Prognostic Implication of Clinical, Radiologic, and Pathologic Features in Patients with Anaplastic Gliomas Tortosa et al., 2003	95	30
Diagnostic, treatment, and demographic factors influencing survival in a population-based study of adult glioma patients in the San Francisco Bay Area Wrensch et al., 2006	105	31

[1] Porcentaje de pacientes diagnosticados mediante biopsia estereotáxica

En tercer lugar, aunque hoy en día la clasificación histológica universalmente aceptada y más extendida es la de la OMS, existen otras clasificaciones que no son estrictamente superponibles a ésta, y que han sido empleadas en el pasado, lo que debe tenerse muy en cuenta a la hora de comparar distintas series o extrapolar resultados de las mimas (Tabla 4.):

Tabla 4.: Clasificaciones histopatológicas. Tomado de See et al. (See y Gilbert, 2004)

Grading System	***Grades***		
WHO 2006	***Grade II diffuse astrocytoma***	***Grade III anaplastic astrocytoma***	***Grade IV glioblastoma multiforme***
	Well-differentiated fibrillary or gemistocytic neoplastic astrocytes. Moderately increased cellularity. Mitotic activity generally absent.	*Increased cellularity. Nuclear atypia. Marked mitotic activity. No microvascular proliferation or necrosis.*	*Poorly differentiated, pleomorphic astrocytic neoplastic cells, marked nuclear atypia. Brisk mitotic activity. Microvascular proliferation and/or necrosis.*
Ringertz	***Astrocytoma***	***Intermediate-type astrocytoma***	***Glioblastoma multiforme***
	Mildly increased cellularity. Mild nuclear atypia. Scant mitotic activity. No vascular proliferation or necrosis.	*Moderate pleomorphic astrocytes. Mitotic activity present. Moderate vascular proliferation may be seen. No necrosis.*	*Markedly pleomorphic astrocytes. High cellularity. Frequent mitotic activity. Increased vascularity. Necrosis present.*
Kernohan and Sayre	***Astrocytoma grade 1, fibrillary and protoplasmic astrocytoma***	***Astrocytoma grade 2, astroblastoma***	***Astrocytoma grade 3 and 4, glioblastoma multiforme***
	Increased cellularity, well differentiated neoplastic astrocytes.	*Increased cellularity. Nuclear atypia/pleomorphism. No mitotic activity or necrosis.*	*Marked pleomorphism/nuclear atypia. Increased mitotic activity. Vascular proliferation and necrosis present. The degree of above changes separates grade 3 from 4.*
St. Anne–Mayo criteria	***Astrocytoma grade 2***	***Astrocytoma grade 3***	***Astrocytoma grade 4***
1. Nuclear atypia *2. Mitotic activity* *3. Endothelial proliferation* *4. Necrosis*	*One criterion present.*	*Two criteria present.*	*Three or four criteria present.*

The translation of a grade from one grading schema to another is demonstrated by the overlap of the cells in the table; for example, astrocytomas with mitotic activity, cellular pleomorphism, and microvascular proliferation would be classified as "intermediate-type astrocytoma" or "GBM" according to the Ringertz or WHO schema, respectively.
The Kernohan schema can also be described to separate astrocytomas into two groups, low-grade astrocytomas (Kernohan grades 1 and 2) and high-grade astrocytomas (Kernohan grades 3 and 4).

El último aspecto a considerar y motivo de debate en foros actuales de neurooncología, es el hecho de que existe un cierto componente de subjetividad en la interpretación histopatológica de cualquier lesión tumoral, lo que disminuye claramente la reproducibilidad y la coincidencia en los diagnósticos incluso entre neuropatólogos expertos (Compostella et al., 2007; Gadji et al., 2009).

La OMS establece como características histopatológicas principales de los gliomas anaplásicos el ser difusamente infiltrativos, con celularidad aumentada, atipia nuclear y marcada actividad mitótica (Louis et al., 2007). En el caso concreto de los oligoastrocitomas anaplásicos al no existir marcadores específicos, el diagnóstico puede resultar especialmente complejo en casos con considerable pleomorfismo. Por ello, un tumor clasificado como glioma anaplásico por un determinado patólogo puede no serlo según el criterio de otro. En el estudio multicéntrico fase II de temozolomida en pacientes con recidiva de astrocitoma anaplásico y oligoastrocitoma anaplásico publicado en J Clin Oncol (Yung et al., 1999), sólo el 69% de los casos incluidos inicialmente en el estudio, fueron considerados tras la revisión histopatológica central como astrocitomas anaplásicos u oligoastrocitomas anaplásicos.

Todos estos datos llevan a la conclusión de que los criterios de diagnóstico clásicos basados en la histología tumoral que, no sólo se emplean en la actualidad, sino que siguen siendo el estándar de oro para el diagnóstico de los tumores gliales, son claramente imperfectos. Por ello, resulta de vital importancia avanzar en la investigación de la genética molecular de los gliomas para que, a medida que se profundice en el conocimiento de la misma, puedan irse definiendo factores moleculares que de manera objetiva clasifiquen el tumor de una forma precisa y reproducible en cualquier centro. Ello conducirá en un futuro probablemente no muy lejano, a una reclasificación de estos tumores, más allá de aspectos puramente histopatológicos.

5. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS

"A prognostic factor is any measurement available at the time of surgery that correlates with disease free or overall survival in the absence of systemic adjuvant therapy and thus conveys information on the natural course of the disease. In contrast, a predictive factor is any measurement associated with response to a given therapy" (Riemenschneider y Reifenberger, 2009)

"An ideal predictive marker should allow selection of patients for a certain therapy, which would be useless in the absence of that test result"
(van den Bent y Kros, 2007)

La información sobre los factores pronósticos y predictivos inherentes a cada tumor y a las distintas variantes de los mismos es la base para poder efectuar un manejo óptimo del paciente y un tratamiento adecuado en cada caso (Louis et al., 2007).

Los factores pronósticos se relacionan con la supervivencia global o libre de progresión. Aunque por definición no implican respuesta al tratmiento, pueden influir en la toma de decisiones en la práctica clínica, por ejemplo a la hora de indicar tratamiento complementario a un paciente concreto tras la intervención quirúrgica, o a la hora de diseñar la estrategia de seguimiento y planificar la frecuencia con la que efectuar las pruebas radiológicas de control. Además, suelen ser empleados para definir subgrupos homogéneos de pacientes en los ensayos clínicos (Riley et al., 2009).

Por el contrario, son factores predictivos aquellos que indican la probabilidad de que un determinado paciente se beneficie de un tratamiento específico, es decir, se relacionan directamente con la respuesta a un determinado tratamiento (McShane et al., 2005).

Se publican cada año cientos de estudios relacionados con potenciales factores pronósticos en cáncer, pero desafortunadamente la calidad metodológica de la mayoría de ellos es cuestionable. La evidencia ha puesto de manifiesto en la última década que bien por problemas de diseño, por análisis inadecuado o por acúmulo de sesgos, los estudios sobre factores pronósticos resultan en demasiadas ocasiones contradictorios o confusos (Kyzas et al., 2007).

Por otra parte, la variabilidad clínica, histopatológica, biomolecular y genética característica de los gliomas supone un desafío constante para los clínicos que carecen hasta el momento de un modelo predictivo y pronóstico suficientemente sensible y específico (Ramirez et al., 2010). Se hace por ello necesario un progreso en este sentido para que los resultados obtenidos sean suficientemente sólidos y clínicamente relevantes (Hinestrosa et al., 2007).

5.1. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

5.1.1. CLINICOS

Del mismo modo que en el glioblastoma, la edad, el estado funcional valorado según la escala de Karnofsy (Anexo I) y el estado cognitivo medido por el Minimental Test de Folstein (Anexo III) (Burger y Green, 1987; Curran et al., 1993; Folstein et al., 1975; Kleihues et al., 2002; Salminen et al., 1996) en el momento del diagnóstico, son las variables clínicas con mayor influencia pronóstica en los pacientes con glioma anaplásicos, ya sean astrocitomas anaplásicos, oligodendrogliomas anaplásicos u oligoastrocitomas anaplásicos (Buckner, 2003; Curran et al., 1993; Daumas-Duport et al., 1997; Korshunov et al., 2002; Perry et al., 1999; Puduvalli et al., 2003; Tortosa et al., 2003).

Es universalmente aceptado que la edad avanzada es un factor de mal pronóstico en los gliomas anaplásicos, si bien el punto de corte que determina los subgrupos de mejor o peor pronóstico para esta variable no ha sido claramente establecido y varía en las distintas series publicadas. Probablemente el valor pronóstico de la edad, traduzca en realidad determinadas alteraciones moleculares (Kunwar et al., 2001).

El otro factor pronóstico clínico relevante es el estado funcional post-cirugía, de modo que aquellos pacientes con diagnóstico de glioma anaplásico y KPS > 80 presentan una clara ventaja pronóstica en la serie de Tortosa et al. (Tortosa et al., 2003). Otro factor clínico que ha mostrado influencia pronóstica fundamentalmente en algunas series de tumores oligodendrogliales es la presentación clínica en forma de crisis comiciales (Jaeckle et al., 2006). Sin embargo, es un hecho evidente que los factores clínicos sólo explican parte de la variabilidad evolutiva de los pacientes.

5.1.2. RADIOLÓGICOS

El gran avance en las técnicas de neuroimagen de las últimas décadas y su mayor disponibilidad, han permitido profundizar en la búsqueda de características radiológicas con valor pronóstico.

El desarrollo de nueva tecnología que permita identificar determinados aspectos radiológicos con valor pronóstico o predictivo fiables y reproducibles resultará de gran utilidad

en la práctica clínica diaria. En este sentido la localización anatómica del tumor, el volumen planimétrico y geométrico del mismo, la presencia de necrosis radiológica, la existencia de captación de contraste y el patrón de la misma o el depósito en el tumor de determinados radiotrazadores isotópicos, han mostrado influencia pronóstica en algunas series (Buckner, 2003; Cairncross et al., 1998; Cao et al., 2006; Tortosa et al., 2003). Ahora bien, persiste en la actualidad cierta controversia al respecto ya que los resultados de muchas de estas series no han podido ser reproducidos por otros autores.

Del mismo modo, las técnicas de perfusión-difusión por RM han sido empleadas para predecir preoperatoriamente el grado histológico de los gliomas, sin embargo, la enorme heterogeneidad del flujo y volumen sanguíneos (rCBV y rCBF) de estos tumores y en especial de los oligodendrogliomas, hace que hasta la fecha no existan resultados sólidos al respecto (Kapoor et al., 2009), y que por tanto, hoy por hoy ninguna de estas técnicas haya podido sustituir al estándar de oro (el análisis histológico del tejido) en el diagnóstico y valoración pronóstica de los pacientes.

Por otra parte, es imprescindible señalar que el gran avance en las técnicas de neuriomagen acontecido en las últimas décadas, ha supuesto también un cambio en el planteamiento terapéutico de muchas de estas lesiones, permitiendo al neurocirujano realizar una planificación del abordaje quirúrgico con un mayor conocimiento de la localización anatómica de las áreas funcionales, y de sus vías de proyección y su relación respecto al tumor. Esto ha permitido por una parte plantear una cirugía con fines exeréticos en algunos pacientes en los que previamente se hubiera considerado exclusivamente la biopsia, pero además, es probable que haya contribuido probablemente a una disminución de la morbilidad del tratamiento quirúrgico. Ello resulta de vital importancia ya que el estado funcional del paciente en el periodo postoperatorio, condicionará el tratamiento complementario de radio-quimioterapia que recibirá. Por todo lo anteriormente expuesto, técnicas como la RM funcional, o la tractografía (DTI: *"Difusión Tensor Imaging"*) han demostrado ser tremendamente útiles para en neurocirujano tanto en la planificación de la intervención como en la ejecución misma del acto quirúrgico. La generalización en el uso de estas técnicas junto con el apoyo de nuevos asistentes quirúrgicos como la neuronavegación, ha incrementado la confianza del cirujano a la hora de identificar el tumor y de proteger las áreas elocuentes próximas a o infiltradas por el mismo (Piepmeier, 2009).

5.1.3. HISTOLÓGICOS

La clasificación histológica continúa siendo en la actualidad esencial para diseñar la estrategia terapéutica, y el estándar para determinar el pronóstico de los pacientes con glioma (Ramirez et al., 2010). Algunas características histológicas tienen una clara influencia pronóstica en los pacientes con diagnostico de glioma anaplásico. Así, por ejemplo, la presencia de un componente oligodendroglial se asocia a mayores supervivencias globales y libres de progresión (Ohgaki y Kleihues, 2005).

Sin embargo, tal como ya se ha repetido en numerosas ocasiones a lo largo de este trabajo, los gliomas son tumores muy heterogéneos, no sólo en lo que respecta a su curso clínico y a la respuesta a los tratamientos, sino también desde el punto de vista histológico y molecular. En términos generales, se acepta por lo tanto, que el pronóstico es básicamente dependiente de los aspectos histológicos pero que dentro de cada subgrupo histológico y de cada grado la variabilidad es clínicamente significativa. Tal como se ha expuesto previamente, algunos estudios han mostrado que al menos en parte, la variabilidad y, en ocasiones, los resultados contradictorios, podrían deberse a diferencias de criterio entre neuropatólogos (Behin et al., 2003; Donahue et al., 1997).

Otras variables como el índice de proliferación celular (Ki-67) (Coons et al., 1997), los diferentes tipos de necrosis (Kleihues y Ohgaki, 1999; Korshunov et al., 2002; Ralte et al., 2001; Tortosa et al., 2003) o la sobrexpresión de PTEN (Korshunov et al., 2002), han demostrado también influencia pronóstica en algunos estudios. No obstante, el valor pronóstico de estos factores continúa siendo controvertido en la actualidad y son por tanto necesarios más estudios que permitan profundizar en el análisis del valor pronóstico de estas y muchas otras características histológicas. Por ello, cada vez más líneas de investigación se centran en otro tipo de marcadores, ya sean aspectos clínicos, radiológicos o moleculares que complementen los factores histológicos clásicos.

5.1.4. GRADO DE RESECCIÓN

El valor pronóstico del tratamiento quirúrgico en los astrocitomas malignos ha sido, y sorprendentemente continúa siendo hoy en día, punto de controversia en algunos foros y motivo reiterado de publicaciones científicas. A pesar de que los avances diagnósticos y terapéuticos permiten en la actualidad a muchos pacientes con gliomas continuar con su vida cotidiana

durante más tiempo, y han supuesto un aumento considerable en el número de largos supervivientes, la triste realidad es que la mediana de supervivencia de algunos de estos tumores continua siendo similar a la del glioblastoma.

No existe evidencia clase I (y es probable que nunca exista) demostrando el impacto pronóstico en general, del tratamiento quirúrgico en los pacientes con gliomas malignos. La mejor evidencia disponible es clase II o clase III.

Afortunadamente, ciertos problemas metodológicos severos de los que adolecían la mayoría de las series publicadas durante la década de los 80 incluso de los 90, van siendo paulatinamente subsanados al tiempo que la balanza va inclinándose de manera reiterada hacia la confirmación del grado de resección como factor pronóstico independiente de supervivencia (Hales et al., 2010; Sanai y Berger, 2008). La heterogeneidad en la cohorte de tumores y de pacientes analizados, junto con el modo en el que se valoraba el grado de resección, han contribuido en gran medida a la contradicción de los resultados publicados. En muchos estudios la determinación del grado de resección se sustentaba exclusivamente en la impresión del cirujano y no en pruebas de neuroimagen objetivas, a pesar de que es bien conocido, habiendo sido objeto de publicación, el hecho de que sólo en aproximadamente un cuarto de los casos en los que en neurocirujano afirma haber efectuado una resección completa, ésta se confirma en las pruebas de imagen postoperatorias (Albert et al., 1994).

En la actualidad, a pesar de las limitaciones persistentes en la calidad de los datos publicados, cada vez cobra más solidez el valor pronóstico en términos de supervivencia y calidad de vida, de la resección quirúrgica completa en los pacientes con astrocitomas de alto grado (Buckner, 2003).

Sin embargo, a la hora de establecer la indicación de cirugía exerética en un paciente, el neurocirujano deberá tener siempre presente que un aspecto fundamental es efectuar una adecuada selección de los candidatos. Es probable que el impacto pronóstico de la cirugía se haya hecho más patente en las últimas décadas como consecuencia de la posibilidad creciente de llevar a cabo citorreducciones cada vez más amplias pero al mismo tiempo cada vez más seguras. La estimulación eléctrica córtico-subcortical intraoperatoria, la neuronavegación, la RM y la TC intraoperatorias, la cirugía guiada por 5-ALA, etc., han permitido a los neurocirujanos incrementar el grado de resección preservando al máximo la función neurológica. No obstante, el tratamiento quirúrgico de los gliomas debe ser siempre individualizado. Es para ello imprescindible un conocimiento preciso de la morbi-mortalidad de los procedimientos en cada centro, y una adecuación de recursos disponibles para cada caso. Sólo de este modo es posible ofrecer al paciente y a sus familiares una información exacta de los riesgos y un

tratamiento óptimo-adecuado para su caso particular (lo que clásicamente se ha llamado "*tailored surgery*"), sin olvidar nunca que la cirugía como tratamiento, posee una capacidad limitada sobre el control tumoral (Piepmeier, 2009).

Mención aparte merecen los gliomas anaplásicos de localización medular, ya que debido a su carácter infiltrativo la resección radical puede ocasionar déficits neurológicos inaceptables. Por ello, el objetivo de la intervención quirúrgica en estos casos debe limitarse a la obtención de muestra para diagnóstico histológico y el alivio, en la medida de lo posible, del efecto de masa producido por el tumor. El candidato quirúrgico ideal es el paciente con deambulación autónoma preoperatoriamente, ya que en él, la intervención puede demorar la aparición de déficits neurológicos por la enfermedad. Los pacientes con déficit motor instaurado, pueden beneficiarse del tratamiento quirúrgico en el intento de preservar la función esfinteriana. Sin embargo, los pacientes que en el momento del diagnóstico ya presentan una pérdida completa de la función neurológica, no se beneficiarán de la intervención desde el punto de vista sintomático. En aquellos casos con clínica de instauración lenta es habitual, y por otra parte comprensible, que tanto el propio paciente como el neurocirujano opten por la opción de seguimiento y actitud expectante, sin embargo esta estrategia de *"wait and see"* tiene como inconveniente que un tumor que en el momento inicial puede ser extirpable, continúe creciendo haciéndose irresecable o provocando focalidad irreversible a medio plazo (Houten y Cooper, 2000).

A pesar de los avances en las técnicas microquirúrgicas y la cada vez mayor disponibilidad de monitorización neurofisiológica intraoperatoria, no existen series en la literatura que demuestren que el grado de resección en los gliomas malignos medulares influye de manera significativa en la supervivencia de los pacientes. El papel del tratamiento quirúrgico agresivo en el manejo de estos tumores continúa siendo por tanto controvertido.

5.2. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS MOLECULARES

Los estudios más recientes demuestran mediante análisis multivariante, que las variables clásicamente consideradas como pronósticas o predictivas pueden perder su valor si se analizan conjuntamente con los nuevos aspectos de la genética tumoral. Por ello, los esfuerzos en investigación deben dirigirse hacia el conocimiento de la carga genética y la detección de los genes defectuosos responsables del origen y comportamiento tumorales con el fin de avanzar en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas. La aplicación práctica de la genética molecular

será prioritaria en un futuro muy próximo, contribuyendo a la toma de decisiones en la rutina clínica. A medida que se avance en el conocimiento de la identidad genética de los gliomas malignos y puedan definirse factores moleculares con verdadero valor pronóstico o predictivo, se llevará a cabo una reclasificación más allá de los aspectos puramente histopatológicos.

En la actualidad disponemos de un amplio espectro de biomarcadores candidatos que probablemente contribuirán en el futuro a precisar al máximo la información pronóstica y predictiva de cada tumor particular y a optimizar los recursos terapéuticos (Riemenschneider y Reifenberger, 2009; van den Bent y Kros, 2007; Yan et al., 2009; Yip et al., 2008).

Sin embargo la investigación en biomarcadores resulta desafortunadamente densa y prolija, en numerosas ocasiones no concluyente o con resultados carentes de evidencia suficiente para su implementación generalizada (Hainfellner y Heinzl, 2010). Incluso en aquellos tipos de cáncer más prevalente la aplicación traslacional de los resultados de la investigación en biomarcadores resulta muy prolongada en el tiempo.

Hoy se conocen algunos de los factores determinantes que influyen de manera decisiva en el ritmo de la investigación traslacional en biomarcadores de tumores cerebrales:

"Clinically meaningful candidates with low complexity will translate efficiently whereas high complexity decelerates the translational speed"

(Hainfellner y Heinzl, 2010)

En primer lugar, resultan decisivos los aspectos relacionados con la metodología. Es decir, todo aquello que hace referencia a las técnicas de laboratorio necesarias para el estudio de un determinado biomarcador: su coste económico, su complejidad de ejecución, la fiabilidad y reproducibilidad de las mismas, la concordancia interobservador, la complejidad de su interpretación, o la tecnología requerida para su universalización.

No existen en la actualidad estándares metodológicos consensuados ni siquiera para aspectos básicos. Las conferencias de consenso de la OMS abordan fundamentalmente aspectos relacionados con el diagnóstico y clasificación de los gliomas y, a diferencia de la investigación sobre terapia del cáncer, en la que existen unas fases de ensayo clínico perfectamente definidas y estructuradas, en la investigación sobre aspectos pronósticos y biomarcadores no existe tal clasificación (Yip et al., 2008).

El creciente conocimiento sobre la biología molecular de los gliomas, las innovaciones tecnológicas y la cada vez mayor complejidad de los estudios, hace necesario una estandarización de los procedimientos. Por ello en los últimos años y fundamentalmente en Estados Unidos, se han iniciado algunos programas específicos para identificar los factores clave que mejoren la eficiencia de la investigación traslacional, e intentar consensuar aspectos metodológicos (Bast, Jr. et al., 2005).

En segundo lugar la Neuro-oncología no recibe por lo general la misma financiación que otras áreas de investigación en Oncología, quizás por despertar menor interés de la industria farmacéutica al ser una patología menos prevalente, y producir por ello menos impacto social (Hainfellner y Heinzl, 2010).

En tercer lugar por cuestiones estadísticas. La mayoría de la investigación en biomarcadores del cáncer es realizada por grupos de investigadores poco interconectados entre sí, sobre muestras poblacionales pequeñas poco representativas, e incluyendo en ocasiones protocolos terapéuticos heterogéneos y no ajustados a los estándares del momento (Chang et al., 2008). Como consecuencia de todo esto, la potencia estadística de los resultados obtenidos es baja y la probabilidad de obtener falsos positivos elevada (George, 2008; Riley et al., 2009). A fin de incrementar el poder estadístico y por ende la solidez de los resultados, se han desarrollado también recientemente herramientas estadísticas específicas a partir de otras ya existentes, que permiten analizar conjuntamente los resultados obtenidos por varios grupos. El capítulo II dará cuenta de ello.

Por último, en el caso concreto de los biomarcadores neuropatológicos, la eficiencia traslacional parece estar directamente relacionada con el hecho de que la investigación se dirija a mejorar la práctica médica y se diseñe en función de las necesidades de la clínica. Se hace por ello imprescindible un esfuerzo multidisciplinar y multicéntrico, basado en la colaboración y en el intercambio de información entre los profesionales de todas las disciplinas implicadas: neurocirujanos, neurólogos, oncólogos médicos, oncólogos radioterapeutas, neurorradiólogos, neuropatólogos, bioestadísticos, epidemiólogos, etc., del mismo modo que al abordar cuestiones relacionadas con el tratamiento de los pacientes (Chang et al., 2005).

Ahora bien, tal como se expuso previamente, la relevancia de un factor genético debe siempre valorarse de manera conjunta con los parámetros clínicos clásicos con valor predictivo y/o pronóstico conocido (Riley et al., 2009) como la edad, la puntuación en la escala de Karnofsky o el grado histológico (Ino et al., 2000; Newcomb et al., 1998; Rasheed et al., 1999). A fecha de hoy, a pesar de las numerosas alteraciones moleculares ya conocidas y descritas, son pocas las que han demostrado una influencia pronóstica y/o predictiva firme al analizarlas

conjuntamente con las variables clínicas clásicas. Así por ejemplo, los datos publicados sobre el valor pronóstico de la mutación de *TP53,* la amplificación de EGFR o de LOH*10q* han resultado contradictorios (Jarvela et al., 2006; Leenstra et al., 1998). Dos de las alteraciones con mayor relevancia descritas en los últimos años son la metilación del promotor de *MGMT* en glioblastoma como factor predictivo de respuesta a los agentes alquilantes (Esteller et al., 2000; Gerson, 2002; Gorlia et al., 2008; Hegi et al., 2004; Hegi et al., 2005), y la pérdida de heterocigosidad de *1p19q* (LOH*1p19q*) en los tumores oligodendrogliales como factor pronóstico de supervivencia global y predictivo de respuesta al tratamiento (Burger et al., 2001; Cairncross et al., 1998a; Ino et al., 2001; McDonald et al., 2005).

En el caso de los gliomas anaplásicos, el valor pronóstico y/o predictivo de MGMT continúa siendo motivo de controversia en la actualidad y por ello el objeto de estudio del primer y segundo capítulos de la presente tesis.

"La finalidad de la investigación biomédica que implica a personas debe ser la de mejorar los procedimientos diagnósticos, terapéuticos y profilácticos y el conocimiento de la etiología y patogénesis de la enfermedad."

Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

Recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica en personas.

5.2.1. *O*^{6} METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA

La capacidad de reparación del ADN dañado es una función celular esencial que implica a un gran número de genes. Algunos mecanismos de reparación del ADN pueden actuar sobre varios tipos de lesiones mientras que otros son altamente específicos. Del mismo modo, algunos procesos de reparación del ADN celular requieren de reacciones complejas con participación de un gran número de proteínas, mientras que otros, como el llevado a cabo por la *O*^{6}-Metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) dependen exclusivamente de una sola proteína y se llevan a cabo en una sola reacción.

En este sentido, MGMT es capaz, por sí sola y en una sola reacción, de eliminar radicales formados en posición *O*^{6} de la guanina y *O*^{4} de la timina restableciendo el ADN original. Es precisamente la capacidad demetiladora del la *O*^{6} -metilguanina la que confiere el nombre a la proteína. Sin embargo, el hecho de que actúe de manera eficaz contra grupos

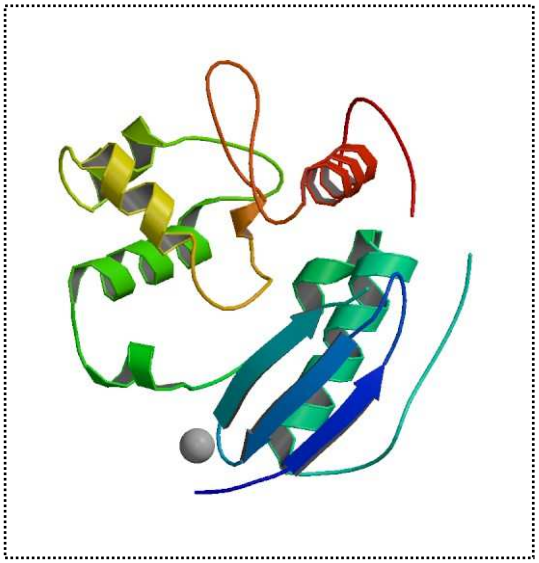
alquilo en general, hace que en numerosos trabajos se refiera a la misma como O^6-Alquilguanina-ADN alquiltransferasa (AGAT) (Pegg et al., 1995).

La lesión del ADN producida por carcinógenos o quimioterápicos alquilantes más relevante desde el punto de vista biológico es precisamente la inducción de radicales O^6-alquilguanina (Margison et al., 2003). Por ello, MGMT desempeña un papel fundamental en la prevención de mutaciones, no sólo en lo que se refiere a prevención de la iniciación tumoral, sino que además, la actividad de la misma confiere protección frente a los quimioterápicos alquilantes como la procarbacina, temozolamida, BCNU, etc. (Jaeckle et al., 1998; Preuss et al., 1996).

5.2.1.1. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN

MGMT es una proteína de 21 KDa (Figura 10.), formada por alrededor de 207 aminoácidos, cuyo gen se sitúa en el extremo telomérico del brazo largo del cromosoma *10* (*10q26*) (Margison et al., 2003; Pieper, 1997).

Figura 10.: O6-metilguanina ADN metiltransferasa



Se estima que el tamaño del gen es superior a 170 kb en el humano (Ueda et al., 2004). La parte del gen con actividad de promotor ha sido aislada, habiéndose observado que posee similitudes con muchos otros "genes guardianes del genoma".

Para iniciar el proceso de reparación MGMT se une al ADN, escanea individualmente las bases y es capaz de detectar la presencia de radicales metilo en posición O^6 de la guanina; una vez detectados actúa transfiriendo, en una sola reacción, el grupo metilo detectado a una cisteína interna (Cis 145) (Friedman et al., 1999; Issa, 2003; Srivenugopal et al., 2000). De este modo, y como resultado de dicha reacción, se reestablece una guanina normal en el ADN celular y se produce un residuo S-metilcisteína que es incorporado por la proteína reparadora al liberarse del ADN. Este residuo es extremadamente

estable y no existe mecanismo aparente para eliminarlo, de modo que la molécula de MGMT sufre un cambio conformacional que la inactiva y finalmente un proceso de proteolisis. La cinética de este proceso reparador es rápida, la eliminación del 90% de los grupos metilo ocurre en aproximadamente 10 min. (Nakasu et al., 2004; Roberts et al., 2006).

Así, por cada lesión reparada queda inactivada una molécula de MGMT; dicho de otro modo, la capacidad de reparación de lesiones en la célula, depende del número de moléculas de MGMT que contiene, y de la tasa de síntesis *de novo* de la misma (Esteller et al., 1999; Kaina et al., 2007).

A su vez, la destrucción de una molécula inactiva de MGMT actúa como señal para iniciar de nuevo la síntesis y el transporte de proteína activa desde el citoplasma al núcleo, restableciendo así la célula los niveles de la misma.

Las características fundamentales de la proteína MGMT son:

a) que actúa de manera independiente sin necesidad de ningún cofactor o de la activación de ninguna cascada bioquímica previa,
b) que actúa simultáneamente como transferasa y como aceptor del grupo metilo,
c) que a diferencia de otras proteínas reparadoras del ADN, se comporta como proteína suicida en cuanto que se inactiva en el proceso de reparación y,
e) que repara de modo estequiométrico y, por tanto, puede llegar a deplecionarse (Gerson, 2002; Liu y Gerson, 2006).

Existe expresión de MGMT en todos los tejidos sanos, aunque los niveles de la misma varían considerablemente en los distintos órganos, entre individuos e incluso entre las células del mismo órgano. Existe claramente una variabilidad específica y tejido-dependiente de la actividad de MGMT (Kaina et al., 2007). La expresión de MGMT es normalmente alta en el hígado, moderada en el colon y el pulmón, y relativamente baja en el cerebro y en el tejido linfoide (Margison et al., 2003; Pieper, 1997).

Un aspecto importante a considerar, es que la actividad de MGMT es normalmente mayor en las neoplasias que en los tejidos sanos de las que éstas se originan (Esteller et al., 1999; Jaeckle et al., 1998), y que los niveles de MGMT pueden variar de manera importante entre tumores con histología y grado similares (Belanich et al., 1996; Silber et al., 1993). Es decir, la actividad de MGMT en los tumores es heterogénea, y en el caso concreto de los gliomas se acepta, en términos generales, que alrededor del 30-40% carecen del enzima (Nakasu et al., 2004; Silber et al., 1998; Weinstein, 2000).

Para poder actuar, MGMT debe estar presente en el núcleo celular (Lim y Li, 1996), sin embargo, la proteína no contiene una secuencia transportadora al mismo por lo que se cree que tras ser sintetizada en el citoplasma, penetra en el núcleo atravesando los poros de la membrana nuclear en un proceso en el que podría intervenir la fosforilación y que estaría facilitado por una proteína accesoria (Gerson, 2002; Issa, 2003; Pieper, 1997), quedando retenida en el interior del núcleo debido a su capacidad de unión al ADN.

Por todo lo anteriormente expresado, mediante estudios realizados con técnicas de inmunohistoquímica ha podido demostrarse presencia de proteína tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células, aunque con una clara predominancia en el núcleo celular (Belanich et al., 1996; Lee et al., 1996; Rodriguez et al., 2008). Además, es exclusivamente la proteína de localización nuclear la que se considera activa en las células neoplásicas.

Aunque existe la posibilidad de que se produzca también en la célula alguna forma de proteína inactiva, o bien que la proteína pueda permanecer en la célula en su forma inactiva tras haber actuado (Zhukovskaya et al., 1994), la mayoría de las células en las que no se observa actividad de MGMT carecen de la proteína o del ARNm, aunque sí que contienen el gen *MGMT* (Qian y Brent, 1997).

Se conocen en la actualidad algunos polimorfismos de línea germinal para *MGMT* aunque hasta la fecha, estudios *in vitro* no han demostrado variaciones en la actividad de las diversas variantes de proteína (Wiencke et al., 2005). También se han demostrado algunas mutaciones del gen *MGMT* en líneas celulares y en algunos cánceres colorrectales (Halford et al., 2005). Del mismo modo, Heighway et al. (Heighway et al., 2008) describen en su estudio sobre 83 muestras de tejido pulmonar normal, la existencia de diferencias marcadas en los niveles de expresión de los dos alelos de *MGMT*, si bien hasta la fecha, este hecho no ha sido demostrado en tejidos neoplásicos.

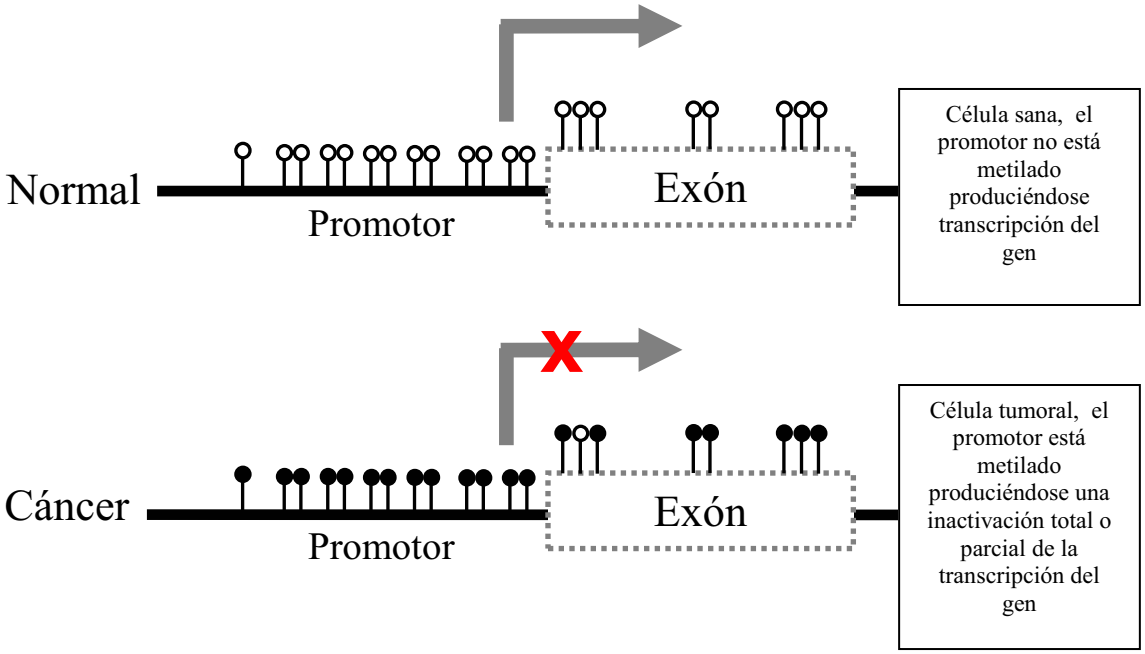
La inactivación completa o parcial del gen *MGMT,* y por tanto, la ausencia o disminución de la expresión de la proteína, no parece deberse a mutaciones ni a delecciones sino a fenómenos epigenéticos. El término epigenética hace referencia a los cambios transmisibles de la expresión genética mediados por mecanismos diferentes a la alteración en la secuencia de nucleótidos del gen y generalmente de naturaleza reversible (Das y Singal, 2004; Esteller, 2002). Es decir, los fenómenos epigenéticos influyen en la actividad del gen pero no implican cambios en la secuencia del ADN (Bae et al., 2002; Kim et al., 2003; Nagarajan y Costello, 2009).

La principal modificación epigenética que acontece en los humanos es la metilación de la citosina localizada en los dinucleótidos CpG. La distribución de dinucleótidos CpG en el genoma humano no es uniforme. Existen áreas denominadas “islas CpG” de aproximadamente

500 a 2000 pb de longitud, donde éstos son especialmente abundantes. Estas islas están generalmente asociadas a zonas donde comienza la transcripción del ADN a ARN, es decir a la zona del promotor del gen, y en condiciones normales, están protegidas frente a los fenómenos de metilación por mecanismos no del todo conocidos en la actualidad (Esteller, 2002; Jones y Laird, 1999; Paz et al., 2003; Robertson y Jones, 2000). Aproximadamente la mitad de los genes del genoma humano contienen promotores ricos en "islas CpG".

La metilación aberrante de las islas CpG del promotor de *MGMT*, como fenómeno epigenético, parece producir alteraciones en la estructura de la cromatina (Costello et al., 1994) (Figura 11.). Estas alteraciones conducen a la posterior condensación de la misma formándose heterocromatina, con la consiguiente inaccesibilidad de los factores de transcripción (Bartolomei y Tilghman, 1997; Das y Singal, 2004; Yu et al., 2004). Ello inactiva la transcripción del gen produciéndose un silenciamiento total o parcial del mismo, y por tanto una disminución o ausencia total de la expresión de la proteína (Baylin y Herman, 2000; Baylin y Herman, 2001; Danam et al., 1999; Danam et al., 2005; Jones, 1999; Qian y Brent, 1997; Robertson y Jones, 2000; Silber et al., 1993).

Figura 11.: Inactivación de la transcripción genética por metilación de las islas CpG del promotor



El silenciamiento de *MGMT* por la presencia de hipermetilación del promotor ha sido demostrado en algunos tipos de tumores tales como el linfoma, el cáncer de pulmón, el cáncer de colon, el cáncer de cabeza y cuello, etc. (Baylin y Herman, 2000; Esteller et al., 1999; Tanaka et al., 2003; Zuo et al., 2004).

No sólo puede darse la ausencia de expresión de MGMT en tejidos neoplásicos sino que curiosamente, también se ha demostrado ausencia de expresión de la misma en tejidos sanos (Qian et al., 1995), en lesiones premalignas e incluso en el tejido sano que rodea algunos tumores. Todo ello sugiere por tanto, que la inactivación de *MGMT* puede ser un evento precoz en el proceso de carcinogénesis (Bobola et al., 2001; Laird, 2003; Silber et al., 1998).

En este sentido, Silber et al. (Silber et al., 1996) analizaron la actividad de la proteína en una serie tumores cerebrales y en el parénquima cerebral situado alrededor de los mismos, demostrando ausencia de actividad de MGMT en el tejido cerebral histológicamente sano alrededor de algunos tumores. A la vista de estos resultados, los autores afirman que MGMT debe estar implicada en el proceso de neurocarcinogénesis, ya que en ausencia de la misma, la célula pierde en gran parte la capacidad de reparación de las lesiones que se produzcan en su ADN. Así, aquellas células gliales carentes de MGMT adquirirán con mayor probabilidad mutaciones que se irán acumulando a lo largo de los años, originándose finalmente un glioma.

Paradójicamente, en la secuencia de acontecimientos que se suceden en la génesis de un glioma maligno, debe incluirse también la readquisición de actividad de MGMT por parte de la célula, ya que tal como demuestran Silber et al. en su serie, en más de la mitad de los casos analizados se halló actividad de MGMT en el tejido neoplásico mientras que no se detectó actividad de la proteína en el tejido cerebral sano peritumoral.

Esta plasticidad en la expresión/actividad de MGMT conferida por mecanismos epigenéticos podría igualmente interesar otros genes del tejido progenitor implicados en la neurocarcinogénesis.

5.2.1.2. PRINCIPALES TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE MGMT

Dado que MGMT parece conferir resistencia a los agentes alquilantes en un amplio espectro de tumores humanos entre los que se encuentra el glioblastoma, mediante la reparación de la lesión producida por éstos en el ADN tumoral (Baylin y Herman, 2000; Esteller et al., 1999; Jones y Laird, 1999; Robertson y Jones, 2000), y que además, varios estudios han demostrado que el silenciamiento epigenético de MGMT podría, en sí mismo, ser factor

pronóstico (Esteller et al., 2000; Hegi et al., 2005), algunos expertos han propuesto recientemente que en los ensayos clínicos se estratifique a los pacientes en base al estado de MGMT (Gorlia et al., 2008; Sadones et al., 2009).

Durante la última década, el estudio de MGMT se ha efectuado de manera muy diversa por los distintos grupos de investigación, habiéndose empleado numerosas técnicas de laboratorio cuyos resultados no son por tanto comparables. No existe hasta la fecha consenso respecto de la estrategia metodológica y el protocolo óptimo que debe ser empleado para el estudio de MGMT en los gliomas.

En primer lugar se han empleado técnicas para estudio de ADN. Este ha sido el método más empleado aunque con importante variabilidad de resultados entre los estudios: MSP (Hegi et al., 2005), MSO (*"methylation specific oligonucleotide"* (Zhang et al., 2008)), Nested PCR (Matsukura et al., 2003), MethyLight PCR (PCR basada en fluorescencia) (Metellus et al., 2009), QMSP (*"quialitative MSP")* (Sadones et al., 2009), pirosecuenciación (Mikeska et al., 2007; Shaw et al., 2008), COBRA (Mikeska et al., 2007), MS-MLPA (Jeuken et al., 2007), etc.

En segundo lugar, técnicas centradas en la determinación de ARMm: RT-PCR (Tanaka et al., 2005).

Por último, algunos grupos entre los que nos incluimos, hemos recurrido a técnicas de laboratorio que permitan la evaluación directa de la proteína, tanto de su expresión como de su actividad: IHQ (Brell et al., 2005), Western Blot (Hongeng et al., 1997), o inmunofluorescencia (Belanich et al., 1996).

Ninguna de las técnicas empleadas ha sido, hasta la fecha, estandarizada ni validada para su uso clínico en la práctica diaria. Por ello, la técnica idónea para el análisis de MGMT es todavía motivo de discusión y controversia en la literatura (Chinot et al., 2007; Idbaih et al., 2007; Karayan-Tapon et al., 2009; Shaw et al., 2008; Yip et al., 2008), no existiendo a día de hoy un método que siendo fiable, rápido, eficaz y rentable, sea universalmente aceptado como patrón oro para su uso en la práctica clínica diaria (Hainfellner y Heinzl, 2010; Wojdacz y Dobrovic, 2007).

De todas las técnicas anteriormente enumeradas, han sido fundamentalmente la MSP y la IHQ las más empleadas por los diversos grupos durante la última década y por ello nos centraremos brevemente en ellas:

- PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MSP) (Herman et al., 1996):

Se trata de una técnica dirigida al análisis de la metilación de ADN, concretamente al análisis de metilación de las islas CpG del promotor de *MGMT* que es una alteración química y biológicamente estable (Widschwendter y Jones, 2002). Se fundamenta en la conversión química de citosina a uracilo que se produce en el ADN tras someterlo a tratamiento con bisulfito (Clark et al., 1994) (Figura 12.).

Figura 12.: Fundamento de la MSP. El tratamiento del ADN con bisulfito originará la conversión de la citosina por uracilo. La presencia de metilación en la citosina, impedirá el cambio a uracilo.

La reacción de transformación a uracilo sucederá en todas las citosinas excepto en las que se encuentren metiladas (5-metilcitosina) que son resistentes a la conversión. El ADN modificado puede ser posteriormente estudiado mediante amplificación, secuenciación, etc.

Como es objeto de la segunda parte de este trabajo y será ampliamente expuesto, no nos centraremos en este apartado en la exposición de las ventajas e inconvenientes de esta técnica. Sin embargo, si que se harán algunas reflexiones importantes sobre la misma.

Se trata de una técnica que permite estudiar tanto material congelado como proveniente de muestras de parafina (Herman et al., 1996). Sin embargo, es muy dependiente de la calidad del ADN, siendo la rentabilidad diagnóstica y la fiabilidad de los resultados claramente superior si se realiza sobre muestras de tejido congelado. Por otra parte, el proceso químico de tratamiento con bisulfito puede en sí mismo degradar el ADN tumoral por lo que si de partida éste no es de una calidad óptima podría verse seriamente deteriorado, no consiguiéndose resultados válidos. Además, tanto el diseño de los cebadores como las condiciones del

termociclador para la PCR, son también críticos en el procedimiento y condicionan de manera sustantiva los resultados obtenidos (Esteller, 2002).

Resumiendo brevemente, se trata de una técnica que presenta ciertos problemas metodológicos que limitan su aplicabilidad en la rutina del diagnóstico clínico, fundamentalmente su relativa alta complejidad, que el proceso que conlleva la realización de la misma es prolongado en el tiempo, y que es una técnica altamente dependiente de la calidad de la muestra que se analiza (Preusser et al., 2008; Yip et al., 2008).

No obstante y a pesar de todas estas cuestiones, desde que en el año 2005 Hegi et al. (Hegi et al., 2005) publicaran sus resultados concernientes al valor pronóstico de la metilación del promotor de *MGMT* en una serie de pacientes con diagnostico de glioblastoma tratados con radioterapia y temozolamida, la MSP ha sido considerada como técnica de referencia y ha sido la más frecuentemente empleada para el estudio de la metilación de islas CpG del promotor de *MGMT* (Esteller, 2002; Fraga y Esteller, 2002).

Al mimo tiempo, y también durante los últimos años, diversos grupos han desarrollado algunas modificaciones de esta técnica en un intento de mejorar su eficacia y rentabilidad. Una vía de investigación iniciada en otros cánceres de la economía sistémica, todavía de manera muy incipiente en los tumores cerebrales, pero sin duda con un gran interés, ha sido el empleo de la MSP para la detección de ADN libre tumoral en sangre periférica o plasma de los pacientes. Es un hecho conocido desde la década de los 70 que los tumores en general liberan una cantidad sustancial de ADN a la circulación sistémica probablemente debido a los fenómenos de necrosis celular y apoptosis que en ellos se producen. De este modo, algunos estudios han demostrado mediante la determinación de ADN libre en plasma o sangre periférica, que en pacientes con cáncer se detectan cantidades elevadas de ADN libre (entre 30-1200 ng/ml), mientras que en pacientes sanos, sin enfermedad neoplásica los niveles detectados son claramente inferiores (<100ng/ml normalmente) (Weaver et al., 2006). Además, el ADN libre circulante en sangre periférica o plasma, posee las mismas alteraciones genéticas que el tumor del cual proviene (Ramirez et al., 2003), por lo que algunos estudios han demostrado que es posible detectar ADN con metilación del promotor de *MGMT* circulando en la sangre periférica de pacientes con glioma (Balaña et al., 2003). Dado que no existe hoy en día ningún biomarcador específico de glioma, la validación de estos estudios resultaría un enorme avance y una gran ventaja en el seguimiento del paciente, en la valoración del efecto de las terapias complementarias que se le aplican, al tiempo que resultaría de gran utilidad para el desarrollo de nuevos tratamientos (Das y Singal, 2004; Esteller, 2002; Jones, 2002). Existen sin embargo

todavía algunas cuestiones sin resolver por lo que se necesitan más estudios para confirmar estos hallazgos.

- INMUNOHISTOQUÍMICA:

Se trata de una técnica sencilla y ampliamente disponible en la actualidad en cualquier laboratorio de anatomía patológica. Existe evidencia en la literatura sobre la adecuada correlación entre la actividad de la proteína MGMT y la expresión de la misma en la célula (Chen et al., 1997; Preuss et al., 1995; Zaidi et al., 1996), por lo que desde un punto de vista teórico, la IHQ sería una técnica idónea para evaluar la presencia de expresión/actividad de MGMT y por tanto la quimioresistencia tumoral.

Además, es más sencilla en la ejecución, más económica y más rápida que la MSP (Andersson et al., 2004; Capper et al., 2008; Preusser et al., 2008). Consecuentemente, la IHQ se ha convertido en el método más comúnmente empleado para el análisis de la expresión de MGMT en la última década (Yachi et al., 2008).

Existen varios anticuerpos monoclonales comercializados y disponibles en el mercado. Sólo se considera como expresión válida la tinción nuclear uniforme, valorándose por tanto como carentes de expresión de MGMT (inmuno-negativos) aquellos tumores cuyas células presentan reactividad sólo citoplasmática o bien tinción nuclear pero de aspecto granular en lugar de uniforme (McLendon et al., 1998).

Habitualmente la valoración de las muestras se realiza de manera semicuantitativa aunque también puede efectuarse de manera cualitativa. La forma más común de realizar la valoración semicuantitativa es mediante la cuantificación del porcentaje de células positivas de un total de 1000. No obstante, las diferencias metodológicas entre los diversos grupos que han elegido esta técnica para el estudio de la MGMT es precisamente una de las principales críticas que efectúan los detractores de la misma, y ciertamente uno de sus puntos débiles. Es decir, no existe homogeneidad de criterios en lo que se refiere a evaluación de la inmunohistoquímica. Por ejemplo, el nivel de inmunoexpresión a partir del cual se considera un tumor como positivo, es decir, el umbral seleccionado para considerar un tumor como positivo es variable en los diversos estudios publicados. Como será ampliamente expuesto en la segunda parte de este trabajo, mientras que algunos autores consideran como inmuno-positivos aquellos tumores con un porcentaje de celularidad positiva igual o superior al 5%, otros establecen el umbral en el 10%, 25% o incluso el 50%. En otros estudios se establece incluso una escala valorando no sólo

aspectos puramente cuantitativos, como son el porcentaje de núcleos positivos, sino también la intensidad de la inmunoexpresión obtenida.

Lógicamente, una de las principales ventajas de la IHQ frente a otras técnicas es que no precisa de material congelado. Este dato, junto al hecho de que hoy en día la IHQ es una técnica de laboratorio rutinaria y ampliamente extendida no sólo en términos de investigación sino también con fines diagnósticos en la mayoría de laboratorios de anatomía patológica, la hace ser especialmente atractiva para el estudio de MGMT.

No obstante, y tal como se mostrará más adelante, esta técnica adolece a su vez de varios problemas que impiden su consideración como patrón oro.

Sorprendentemente, los estudios que han evaluado la correlación entre la presencia de metilación del promotor y la pérdida de la expresión de la proteína de MGMT han mostrado resultados contradictorios, no sólo en tumores cerebrales sino también en otro tipo de neoplasias. Dado que, tal como se ha expuesto anteriormente, existe una falta de datos objetivos para recomendar unas técnicas frente a otras, existe necesidad en la actualidad de efectuar un análisis comparativo riguroso y una validación de la reproducibilidad intra- e interlaboratorio de los diversos métodos. De esta forma, podrá identificarse el método idóneo para la práctica clínica diaria (Preusser, 2009).

Por todo lo anteriormente expuesto, la segunda parte de la presente tesis la compone una Revisión Sistemática y un Meta-análisis de los trabajos publicados en la literatura concernientes a la relación entre la IHQ y la MSP.

5.2.2. PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD *1p19q* (LOH *1p19q*)

La pérdida de heterocigosidad de *1p19q* (LOH*1p19q* o co-delección *1p19q*) es un evento genético precoz en la histogénesis de los tumores oligodendrogliales (Bello et al., 1994; Bello et al., 1995) y es considerado como el distintivo genético de los mismos, estando presente en alrededor del 80-90% de los oligodendrogliomas puros y en alrededor del 45% de los oligoastrocitomas (Kraus et al., 1995; Kros et al., 1999; Rasheed et al., 1999; Reifenberger et al., 1994; Sanson et al., 2002). Más aún, la presencia en un tumor glial de co-delección *1p19q* se considera hoy marcador diagnóstico de tumor oligodendroglial (Aldape et al., 2007).

Cairncross y Macdonald (Cairncross y Macdonald, 1988) describen por primera vez la mayor tasa de respuestas a la quimioterapia de los tumores oligodendrogliales en relación a los tumores astrocitarios, y la asociación entre esta quimiosensibilidad y la presencia de LOH*1p19q*

en el tumor. Posteriormente, numerosos trabajos han reproducido estos hallazgos, y es hoy un hecho aceptado que la presencia de LOH*1p* o LOH*1p19q* en un glioma anaplásico con componente oligodendroglial conlleva una mayor quimiosensibilidad, una mayor duración de la respuesta a la quimioterapia, así como mayor supervivencia global y libre de progresión del paciente, mientras que sólo un 25% de los tumores que no presentan dichas delecciones responderán al tratamiento quimioterápico (Cairncross et al., 1998; Capelle et al., 2009; Hoang-Xuan et al., 2004; Smith et al., 2000; Stupp et al., 2006; Vogelbaum et al., 2009).

Además de ser factor predictivo de respuesta a la quimioterapia, la presencia de co-delección *1p19q* parece ser además predictivo de respuesta a la radioterapia, en cuanto que se ha asociado también a una mayor supervivencia en pacientes que recibieron exclusivamente tratamiento radioterápico (Bauman et al., 2000).

Pero LOH*1p19q* no sólo es un biomarcador con valor predictivo, sino que además tal como se ha apuntado previamente, es un factor pronóstico. Por lo tanto, la respuesta a la quimio y a la radioterapia, la duración de esta respuesta, y la supervivencia global y libre de progresión, parecen asociarse a la presencia combinada de LOH*1p19q* (Cairncross et al., 1998; Hoang-Xuan et al., 2004; Ino et al., 2001; Mueller et al., 2002; Smith et al., 2000; van den Bent et al., 2003).

Mientras que algunos autores afirman que se trata de un factor pronóstico con mayor impacto incluso que las variables clínicas clásicas conocidas como la edad del paciente, el estado funcional determinado por la escala de Karnofsky, el grado histológico de la OMS, el grado de resección quirúrgica o la radioterapia postoperatoria (Aldape et al., 2007; Cairncross et al., 1998; Ino et al., 2001; Smith et al., 2000), no sólo en oligodendrogliomas puros, sino también en oligoastrocitomas y no sólo en los gliomas anaplásicos sino también en los de bajo grado (McDonald et al., 2005; Walker et al., 2004), otros autores afirman que el valor pronóstico de LOH*1p19q* en los gliomas de bajo grado es controvertido (Weller et al., 2007), y que la presencia de LOH*1p19q* no es un factor pronóstico sólido en aquellos pacientes con tumores oligodendrogliales que no reciben tratamiento radio o quimioterápico (Weller et al., 2007).

En cualquier caso lo que sí parece claro es que existe un remanente de tumores con componente oligodendroglial, que en algunas series se cifra hasta en un 50% de los casos, que no responderán al tratamiento quimioterápico y que presentarán un curso clínico agresivo similar incluso al del glioblastoma (Kapoor et al., 2009; Kuo et al., 2009).

Otro aspecto importante a tener en consideración es que tal y como demuestran Lavon et al. en su estudio longitudinal (Lavon et al., 2007), la identidad genética de un tumor oligodendroglial puede variar a lo largo del tiempo. Así, los autores demuestran diferencias

moleculares en el momento de la recidiva/progresión hasta en un tercio de los tumores analizados, pudiendo implicar estas diferencias tanto a *1p* como a *19q*, y siendo más frecuentes en los tumores mixtos. La interpretación que realizan de estos hallazgos es que en el momento de la recidiva/progresión, es probable que se produzca una sobre-representación clonal de las células más resistentes a los tratamientos.

A diferencia de lo que sucede con la MGMT, las razones, al menos en un plano teórico, por las que LOH*1p19q* confiere quimiosensibilidad y/o mejor pronóstico no son conocidas en la actualidad. Por ello continúa siendo motivo de investigación la búsqueda de los genes supresores responsables situados en ambos brazos cromosómicos (Hoang-Xuan et al., 2001; Huang et al., 2009; Ueki et al., 2002), y que a día de hoy se piensa residen en las regiones 1p34-36 y 19q13 (Tews et al., 2006). En concreto, la inusual presencia de LOH*19q* en tumores no gliales sugiere la posible existencia de genes supresores específicos gliales (Smith et al., 2000), que estando inactivos en condiciones basales, pudieran quedar desenmascarados por la pérdida de heterocigosidad al residir en el alelo remanente (Cairncross et al., 1998; Sanson et al., 2002). La disminución o ausencia de expresión del gen *STATHMIN* situado en *1p* parece que pudiera jugar un papel fundamental en la quimiosensibilidad de estos gliomas (Ngo et al., 2007).

La existencia de una eventual asociación entre metilación del promotor de *MGMT* o ausencia de expresión de la proteína MGMT y co-delección *1p19q,* sigue siendo motivo de controversia. Algunos grupos han demostrado una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables (Brandes et al., 2006; Choi et al., 2010; Kim et al., 2005; Wick et al., 2009), habiéndose sugerido que la quimiosensibilidad de los gliomas con componente oligodendroglial podría deberse por tanto a una baja o nula actividad de MGMT en ellos (Levin et al., 2006). Sin embargo, una vez más, los resultados publicados por diversos grupos al respecto son contradictorios (Huang et al., 2009; McLendon et al., 2005; Möllemann et al., 2005; Watanabe et al., 2002). La frecuencia de hipermetilación del promotor parece no obstante ser superior, y los niveles de proteína MGMT inferiores en los tumores oligodendrogliales respecto a los astrocitarios, habiéndose descrito metilación del promotor hasta en un 88% de los oligodendrogliomas con co-delección *1p19q* (Brandes et al., 2006; Choi et al., 2010; Möllemann et al., 2005; Nakasu et al., 2004; Silber et al., 1998).

Paradójicamente y a diferencia de lo que sucede en el glioblastoma, la hipermetilación del promotor de *MGMT* no parece ser factor pronóstico independiente en los tumores oligodendrogliales (Brandes et al., 2006; Choi et al., 2010; Watanabe et al., 2002).

Por otra parte, algunos autores apuntan que la presencia de LOH*1p19q* y la sobre-expresión de p53 parecen ser mutuamente excluyentes (Huang et al., 2009; Ino et al., 2001;

Ueki et al., 2002; Watanabe et al., 2002), si bien los resultados son también discordantes en los diversos grupos. De este modo, mientras que entre el 30 y el 50% de los oligoastrocitomas presentan LOH*1p19q*, y se asemejan por tanto a los oligodendrogliomas, alrededor del 30% de estos tumores presentan alteraciones genéticas propias de los tumores astrocitarios puros, esto es mutación de *TP53* y/o LOH*17p*, y carecen de LOH*1p19q* (Kraus et al., 1995; Mueller et al., 2002; Reifenberger et al., 1994). Esto sugiere por tanto que los oligoastrocitomas son neoplasias clonales que se originan de una sola célula precursora y no una composición de tumores distintos que se originan y desarrollan de manera sincrónica (von Deimling et al., 2007). La hipótesis de la clonalidad de estas neoplasias es la más aceptada en la actualidad (Kraus et al., 1995; Louis et al., 2007).

Bajo el epígrafe oligoastrocitoma se incluye por lo tanto, un conjunto de tumores que si bien son morfológicamente similares, genéticamente presentan diferencias relevantes. Así, podrían distinguirse por una parte aquellos tumores mixtos que asientan en el lóbulo temporal y que presentan mutaciones de *TP53.* Desde un punto de vista genético, estos parecen ser más próximos a los astrocitomas*,* mostrando incluso un patrón morfológico con predominio astrocitario. Por otro lado estarían aquellos localizados en el lóbulo frontal, que presentan con mayor frecuencia delección de *1p19q*, y que por lo tanto parecen estar genéticamente más próximos a los oligodendrogliomas. En estos además predomina el componente oligodendroglial en la histología (Eoli et al., 2006; Mueller et al., 2002; Reifenberger y Louis, 2003).

Por todo esto, es hoy opinión de algunos expertos que aquellos tumores que se clasifican rutinariamente como oligoastrocitomas son en realidad a nivel molecular oligodendrogliomas (si poseen LOH*1p19q*) o astrocitomas (si presentan mutaciones de *TP53*) (van den Bent y Kros, 2007).

En el capítulo III de este trabajo, se realiza un estudio detallado sobre esta asociación genético-topográfica y se analizan estas cuestiones en una serie de tumores oligodendrogliales que incluye no sólo tumores mixtos sino también oligodendrogliomas puros.

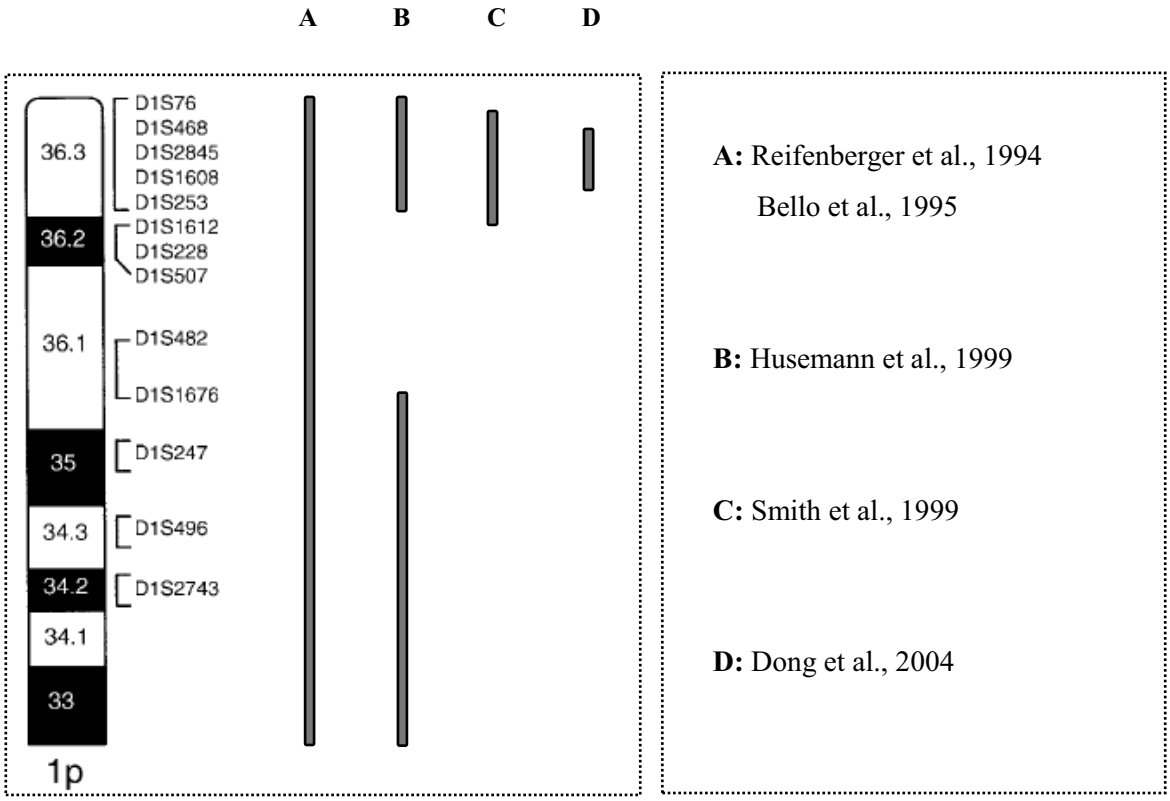
Algunos estudios recientes sugieren que el significado biológico LOH*1p19,* reside en realidad en la delección de *1p*, siendo la de *19q* de mucha menor importancia (Piepmeier, 2009; Thiessen et al., 2003). Y en cualquier caso, en lo que coinciden todos los trabajos es en el hecho de que tarde o temprano, la mayoría de los tumores oligodendrogliales incluso con LOH*1p19q* recurrirán o progresarán y requerirán tratamientos adicionales (Thiessen et al., 2003). Por ello, la identificación de aquellos factores responsables del comportamiento tumoral sigue

despertando un enorme interés ya que su conocimiento preciso resultaría de enorme utilidad en la práctica clínica (Snuderl et al., 2009).

En este sentido, algunos autores han apuntado que la existencia de polisomía en los oligoastrocitomas, se asocia a recurrencias precoces incluso en los casos de tumores con pérdida de heterocigosidad de *1p19q* asociada. A pesar de la mayor precocidad de las recurrencias, estas pueden responder a quimioterapia de segunda línea y su pronóstico continúa siendo mejor que el de los tumores con alelos intactos (Snuderl et al., 2009). El mecanismo por el que se produce esta polisomía es desconocido. Dado que la existencia de copias adicionales de los cromosomas *1* y *19* resulta fácilmente identificable mediante la técnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), una de las técnicas de laboratorio más empleada en la práctica clínica para el estudio de *1p19q,* en caso de confirmarse estos hallazgos el estudio de polisomía podría ser fácilmente implementado en la rutina clínica diaria.

Por otra parte, aunque se han descrito distintos patrones de LOH *1p* (delección completa desde el centrómero hasta el telómero, o bien delección parcial intersticial o telomérica) (Felsberg et al., 2004; Hashimoto et al., 2003) (Figura 13.), sólo la delección completa parece asociarse de manera estadísticamente significativa a la co-existencia de LOH*19q*, al fenotipo oligodendroglial, y a una mayor supervivencia global y libre de progresión en el paciente. Por el contrario, la presencia de delecciones parciales de *1p* no parece asociarse en ningún caso a LOH*19q*, y es frecuentemente observada en tumores astrocitarios con un comportamiento más agresivo (Felsberg et al., 2004; Idbaih et al., 2008). Este dato resulta importante ya que ninguno de los dos métodos mayoritariamente empleados en la práctica clínica, FISH y análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH) o análisis de microsatélites en *1p36,* permiten discriminar la situación de delección parcial de *1p* (Idbaih et al., 2005), siendo necesario para ello el empleo de técnicas más sofisticadas.

Figura 13. Mapas de delección de 1p estudiados por diversos autores (modificado de Dong et al. (Dong et al., 2004))



Del mismo modo que ocurre para el estudio de MGMT, la técnica idónea para el análisis de la co-delección *1p19q* también ha sido motivo de debate en la última década (Idbaih et al., 2005; Jeuken et al., 2001). Desde el punto de vista técnico el análisis de pérdida de heterocigosidad o microsatélites tiene la ventaja de la sencillez en la interpretación de los resultados, y que detecta todas las pérdidas alélicas. Por el contrario, tiene el inconveniente de su complejidad y laboriosidad en la ejecución y que requiere de ADN genómico que normalmente se obtiene de sangre periférica del paciente, lo que en la mayoría de los casos supone una dificultad añadida.

La técnica de FISH se basa en el empleo de sondas marcadas con fluorescencia y específicas de locus concretos situados en *1p* y *19q*. Tiene la ventaja de que es más breve en su ejecución al implicar menor número de pasos, que proporciona información *in situ*, y que no requiere de ADN genómico. Dado que permite analizar además la presencia de polisomías *1* y

19, puede resultar más adecuada en estudios sobre factores predictivos (Snuderl et al., 2009). Por el contrario tiene el inconveniente de su mayor complejidad a la hora de poner la técnica a punto en un centro en el que no se use de manera rutinaria, y que no detecta todas las pérdidas alélicas (Reifenberger y Louis, 2003).

Ambas técnicas han sido, en cualquier caso, validadas en la práctica clínica actual y al compararlas han demostrado una alta correlación de sus resultados (van den Bent et al., 2003), de modo que la elección de una u otra obedece más a preferencias de las distintas instituciones que a una superioridad real de una frente a la otra y los resultados de ambas se consideran perfectamente comparables.

Otras técnicas menos empleadas son la llamada CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) que mediante el empleo de múltiples sondas permite determinar el patrón de delección de *1p* (Idbaih et al., 2008), PCR cuantitativas etc. Idealmente cualquiera de las técnicas debería realizarse sobre tejido congelado para disponer de un ADN de máxima calidad.

Capítulo I

VALOR PRONÓSTICO DE LA O6-METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA VALORADA MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR Y EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN UNA SERIE DE GLIOMAS ANAPLÁSICOS

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Mientras que los glioblastomas, astrocitomas más frecuentes y más agresivos, están uniformemente asociados a un mal pronóstico, las supervivencia de los pacientes con diagnóstico de glioma anaplásico (grado III de la OMS) varía de una manera sustancial (Donahue et al., 1997; Fischbach et al., 1991; Nakamura et al., 1997; Salcman et al., 1994).

A pesar de un tratamiento óptimo, consistente fundamentalmente en la máxima resección segura seguida de radioterapia y quimioterapia con agentes alquilantes, la respuesta tumoral y por ende, la supervivencia de los pacientes, oscila considerablemente (Stewart, 2002), existiendo enfermos cuya evolución en el tiempo se aproxima más a la de un glioma de bajo grado, mientras que otros presentan un curso clínico más propio de un glioblastoma.

Este hecho sugiere que probablemente un gran número de factores incluyendo aspectos clínicos del paciente, aspectos moleculares del tumor y detalles del tratamiento influyen de manera conjunta (Buckner, 2003; Tortosa et al., 2003) en el pronóstico final.

A medida que van surgiendo nuevas opciones de tratamiento, se hace imprescindible una correcta y precisa estratificación de los pacientes con el objeto de poder, por una parte, optimizar e individualizar los regímenes más eficaces para cada caso concreto y, por otra, minimizar o incluso evitar la toxicidad a medio-largo plazo de muchas de las terapias que se emplean en pacientes con supervivencias largas.

Por ello, un conocimiento adecuado y detallado de los factores pronósticos resulta imprescindible para el correcto diseño e interpretación de los ensayos clínicos, así como para avanzar en la investigación de nuevas dianas y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Gorlia et al., 2008).

Desde este punto de vista, los gliomas anaplásicos continúan siendo un reto en la actualidad. Desafortunadamente, carecemos hoy en día de datos clínicos, radiológicos, histológicos e incluso moleculares que de una manera sólida y reproducible permitan predecir con exactitud el pronóstico de este grupo tan heterogéneo de pacientes.

Resulta por ello imprescindible la identificación de nuevos factores que permita diferenciar aquellos pacientes que seguirán un curso clínico rápidamente desfavorable en pocos meses, de aquellos que tendrán supervivencias de varios años.

Paradójicamente, una revisión exhaustiva de la literatura pone de manifiesto que son escasas las publicaciones en las que analizan los factores pronósticos en series puras de gliomas grado III. La mayoría de los estudios incluyen conjuntamente gliomas anaplásicos y glioblastomas. Probablemente una de las razones pueda simplemente ser la mayor prevalencia de estos segundos frente a los primeros. Sin embargo, se trata de entidades muy distintas, y por ello deben analizarse de manera independiente.

Los agentes quimioterápicos alquilantes causan la muerte celular mediante la introducción de un radical alquilo en posición O6 de la guanina con la consiguiente formación de uniones letales (*cross-links)* entre las cadenas de ADN adyacentes. La proteína MGMT impide la formación de estos *cross-links*, porque es capaz de reparar la lesión que sobre el ADN tumoral producen los agentes alquilantes (Bae et al., 2002; Jaeckle et al., 1998) (véase más detalladamente en la Introducción).

Trabajos experimentales en líneas celulares y modelos animales de gliomas, han demostrado la existencia de una relación directa entre la actividad de MGMT y la resistencia a los agentes alquilantes (nitrosoureas, radiaciones ionizantes etc.) (Pegg et al., 1995). De hecho, la depleción completa de MGMT mediante el sustrato inhibidor análogo O6-bencilguanina, incrementa la tasa de muerte celular por agentes alquilantes en líneas celulares derivadas de gliomas (Bobola et al., 1995).

En lo que se refiere a la clínica, existe en la actualidad evidencia que demuestra que la presencia de metilación aberrante del promotor de *MGMT*, se correlaciona con la quimiosensibilidad a los agentes alquilantes en el glioblastoma y secundariamente con la supervivencia de los pacientes (Balaña et al., 2003; Esteller et al., 2000; Hegi et al., 2004; Kamiryo et al., 2004; Paz et al., 2003). De este modo, es hoy en día un hecho aceptado en términos generales, que en el glioblastoma el estado de metilación del promotor de *MGMT* es factor predictivo, mientras que su valor como factor pronóstico de supervivencia es algo más controvertido, no habiéndose corroborado en algunas series publicadas (Andersson et al., 2004; Mineura et al., 1996; Paz et al., 2004; Rolhion et al., 1999). En cualquier caso, es opinión de los expertos que, de ahora en adelante, resultará imprescindible la estratificación de los pacientes en función del estado de metilación del promotor de *MGMT* en cualquier estudio clínico o ensayo terapéutico que se realice en GB (Gorlia et al., 2008).

Una de las posibles causas a la que atribuir en parte esta controversia referente a la influencia pronóstica *per se* de MGMT, podría ser una vez más los problemas metodológicos, ya que tal como se ha expuesto previamente, la mayoría de los estudios publicados incluyen series heterogéneas de pacientes con glioma anaplásicos y glioblastomas simultáneamente

(Anda et al., 2003; Andersson et al., 2004; Belanich et al., 1996; Chen et al., 1999; Esteller et al., 2000; Jaeckle et al., 1998; Kamiryo et al., 2004; Mineura et al., 1996; Paz et al., 2004; Silber et al., 1999; Tanaka et al., 2003; Watanabe et al., 2005).

Debido por una parte al diferente comportamiento biológico de ambas entidades y, por otra a la mayor quimiosensibilidad de los gliomas anaplásicos respecto de los glioblastomas, el valor pronóstico o predictivo de cualquier molécula, y por tanto de MGMT, deberá ser evaluado de manera independiente en ambos grupos de tumores.

En el presente capítulo se valora este aspecto en una serie homogénea de pacientes, todos ellos con diagnóstico de glioma anaplásico (gliomas III) y tratados de acuerdo a un protocolo preestablecido y común. De este modo se ha pretendido minimizar el error derivado de la heterogeneidad en la muestra de estudio o en el tratamiento aplicado a la misma.

Otro aspecto importante a considerar es la técnica empleada para el análisis de MGMT dado que algunos problemas metodológicos son, con toda seguridad y al menos parcialmente, responsables de la disparidad de resultados. Las dos técnicas más empleadas hasta la fecha han sido la MSP para evaluar el estado de metilación del promotor de *MGMT*, y la IHQ para analizar la expresión de la proteína MGMT. Sin embargo, existen escasos datos en la literatura concernientes a la concordancia de resultados entre ambas técnicas, es decir, a la relación entre el estado de metilación del promotor de *MGMT* y la expresión de la proteína en los gliomas, y los resultados de estos trabajos son, una vez más, contradictorios. Es decir, no existe a día de hoy evidencia certera de que exista buena correlación entre los resultados de ambas técnicas y por tanto, la comparación de series de la literatura donde se hayan empleado una u otra indistintamente es del todo cuestionable (Anda et al., 2003; Andersson et al., 2004; Esteller et al., 1999; Möllemann et al., 2005; Nakasu et al., 2004). Este aspecto será ampliamente desarrollado en el capítulo II.

El estudio de la expresión proteica de MGMT mediante análisis inmunohistoquímico posee numerosas ventajas respecto a otros métodos. En primer lugar, resulta técnicamente menos complejo, en segundo lugar requiere de escasa cantidad de muestra tumoral, en tercer lugar permite realizar estudios retrospectivos en aquellos centros en los que no se dispone de banco de tumores donde preservar tejido congelado y, por último, permite discriminar la proteína presente en las células tumorales de la expresada por células no neoplásicas ubicadas en el seno del tumor (Capper et al., 2008).

Por otro lado, dado que es la ausencia de proteína reparadora del ADN, esto es la pérdida de actividad de MGMT lo que se supone asociado a la quimiosensibilidad del tumor, el

método inmunohistoquímico debería ser idóneo para el estudio de MGMT en los gliomas (Nakasu et al., 2007).

Todo esto motivó que se seleccionase la IHQ como técnica de detección de la MGMT en nuestro trabajo, evaluando así mismo su correlación con el estado de metilación del promotor de *MGMT*.

2. HIPÓTESIS

Hipótesis conceptual: La expresión de MGMT y/o el estado de metilación del promotor de *MGMT* poseen valor pronóstico de supervivencia global y de supervivencia libre de progresión en los gliomas anaplásicos.

Hipótesis de trabajo: La primera hipótesis que se pretende verificar o refutar es la existencia de concordancia entre la expresión de la proteína MGMT determinada mediante análisis inmunohistoquímico, y el estado de metilación del promotor de *MGMT* determinado mediante MSP.

En segundo lugar se pretende verificar o refutar la hipótesis del valor pronóstico de la proteína MGMT en una serie de gliomas anaplásicos (grado III de la OMS) de nuevo diagnóstico, tratados mediante un protocolo preestablecido común.

3. OBJETIVOS

Objetivo General: Valoración del valor pronóstico de la expresión de MGMT determinada mediante análisis inmunohistoquímico y del estado de metilación del promotor de *MGMT* determinado mediante MSP en una serie homogénea de gliomas grado III de la OMS.

Objetivos Específicos:

1. Estudio de la correlación entre la expresión immunohistoquímica de MGMT y el estado de metilación del promotor de *MGMT* determinado mediante MSP, y evaluación de la concordancia de los resultados obtenidos mediante las dos técnicas de laboratorio.

2. Ponderación de la influencia pronóstica en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión de la expresión de la proteína MGMT determinada mediante análisis inmunohistoquímico.

3. Ponderación de la influencia pronóstica en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión del estado de metilación del promotor de *MGMT* determinado mediante MSP.

4. Ponderación de la influencia pronóstica en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión de la proteína MGMT determinada mediante análisis inmunohistoquimico en el subgrupo de pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico.

5. Ponderación de la influencia pronóstica en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión del estado de metilación del promotor de *MGMT* determinado mediante MSP, en el subgrupo de pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. RECOGIDA DE MUESTRAS Y SELECCIÓN DE PACIENTES

Noventa y tres pacientes con diagnóstico de glioma anaplásico, grado III de la OMS (astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico y oligoastrocitoma anaplásico), atendidos consecutivamente en los Servicios de Neurocirugía del Hospital Universitario de Bellevitge y del Hospital Clínic de Barcelona, entre enero de 1993 y diciembre de 2001, fueron incluidos en el presente estudio para el análisis de MGMT.

Las muestras tumorales fueron recogidas durante el acto quirúrgico, incluidas de manera inmediata en formol y posteriormente en parafina para su conservación y posterior análisis. En algunos casos fue posible además la congelación inmediata de una parte de la muestra a -80ºC y su almacenamiento en un banco de tejidos para su posterior procesamiento.

Todos los tumores fueron verificados histológicamente por dos neuropatólogos independientes y clasificados de acuerdo a la clasificación de la OMS del año 2000 (Louis et al., 2007). Aquellos casos en los que existía discrepancia, fueron reevaluados por ambos patólogos hasta llegar a un consenso.

El diagnóstico de glioma anaplásico se hizo de acuerdo a la presencia de dos o más de los siguientes criterios: atipia nuclear, actividad mitótica o proliferación endotelial mínima.

Se efectuó el diagnóstico de oligoastrocitoma anaplásico cuando el tumor presentaba características de anaplasia y áreas geográficamente distintas de componente astrocitario y oligodendroglial.

Todos los pacientes autorizaron su participación en el estudio mediante un consentimiento informado. Así mismo, la recogida y almacenamiento de muestras fueron autorizados por los Comités de Ética de ambos centro hospitalarios.

Todos los pacientes fueron atendidos de acuerdo a un protocolo de diagnóstico y tratamiento preestablecido y común en ambos centros, que incluía tratamiento quirúrgico con el objetivo de alcanzar la máxima resección segura, seguido de radioterapia y quimioterapia adyuvantes.

El grado de resección quirúrgica fue valorado sobre la TC o RM craneal con y sin contraste realizada en el postoperatorio inmediato, siempre antes del 5º día de la intervención

quirúrgica. La selección de una u otra prueba de neuroimagen se efectuó en función de la disponibilidad de cada centro. En aquellos tumores que no presentaban captación de contraste el grado de resección se determinó también de acuerdo a los hallazgos de la TC o RM de control postoperatorio, según disponibilidad.

Como tratamiento complementario los pacientes recibieron radioterapia y quimioterapia. La radioterapia consistió en irradiación focal sobre el volumen tumoral más 2-3cm de margen alrededor del mismo. Se empleó un sistema de inmovilización rígido estándar para administrar una dosis total de 60Gy en fracciones diarias de 2Gy.

En cuanto a la quimioterapia, ésta consistió en la administración de carmustina [1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea] a dosis de 200 mg/m2 cada 8 semanas durante 6 ciclos, en los pacientes diagnosticados de astrocitoma anaplásico, y de PCV (procarbacina, CCNU y vincristina) a dosis de procarbazina 60 mg/m^2 los días 8-21, CCNU 110 mg/m^2 el día 1, y vincristine 1.4 mg/m^2 los días 8 y 29 cada 6 semanas durante 6 ciclos, para aquellos pacientes diagnosticados de gliomas anaplásicos con componente oligodendroglial (oligodendrogliomas anaplásicos y oligoastrocitomas anaplásicos).

La situación funcional de los pacientes determinada mediante la puntuación en la escala de Karnofsky (Karnofsky et al., 1948) (Anexo I) fue evaluada en el momento del diagnóstico, tras la intervención quirúrgica, en el momento de iniciar la radioterapia y posteriormente a lo largo del seguimiento, en cada control clínico.

Aquellos pacientes con deterioro del estado general severo o mala situación funcional tras la intervención quirúrgica, se consideraron no tributarios de tratamiento complementario radio o quimioterápico, administrándose exclusivamente tratamiento paliativo y medidas de confort.

Del mismo modo, fueron excluidos del tratamiento quimioterápico aquellos pacientes que presentaron progresión de la enfermedad, clínica, radiológica o ambas, durante la radioterapia.

La respuesta tumoral al tratamiento fue evaluada mediante RM y de acuerdo a los criterios de Mcdonald (Macdonald et al., 1990) (Anexo II).

Tras el tratamiento radio y quimioterápico, los pacientes continuaron seguimiento ambulatorio protocolizado consistente en una evaluación clínica y un control radiológico mediante RM craneal cada 4 meses, o en cualquier momento de la evolución ante la sospecha clínica de recidiva/progresión.

Los datos demográficos, clínicos y concernientes a la terapia de los pacientes, se obtuvieron de una base de datos común introducida en ambos centros en 1993 y utilizada de

manera rutinaria en ellos. Otros datos, como por ejemplo los relativos al seguimiento, se obtuvieron de las historias clínicas.

4.2. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

El análisis immunohistoquímico se realizó según el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa (DAKO LSAB2 System, Peroxydase; DAKO, Carpinteria, CA, EUA) y siguiendo el protocolo previamente publicado (Tortosa et al., 2003) que a continuación se expone de manera resumida.

El procedimiento se efectuó sobre secciones de 6μm de las muestras tumorales que se procesaron siguiendo los siguientes pasos:

1) En primer lugar se efectuó la desparafinización de las muestras mediante pase por la batería de alcoholes.

2) A continuación se realizó la inactivación de peroxidasas endógenas con metanol/PBS.

3) Posteriormente se procedió al pre-tratamiento de las muestras en tampón citrato calentado a 90ºC durante 20 minutos.

4) A continuación se efectuó el bloqueo de las uniones inespecíficas con suero normal de caballo al 5% durante dos horas a temperatura ambiente.

5) El siguiente paso consistió en la incubación de las muestras con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4ºC: anticuerpo monoclonal de ratón Ki-67 (DAKO, Carpenteria, CA, EUA) a una dilución 1:25, anticuerpo monoclonal de ratón MGMT (Ab-1, clone MT 3.1, NeoMarkers, Westinghouse, Fremont, CA, EUA) a una dilución 1:20, anticuerpo monoclonal de ratón p53 (pAb1801; Oncogene Science, Manhasset, NY, EUA) a una dilución 1:100, y anticuerpo monoclonal de ratón p16 (Ab-4, NeoMarkers, BioNova, Madrid, España) a una dilución 1:50.

6) Tras la incubación con el anticuerpo primario, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón y anti-conejo IgG durante 10min seguido de complejo avidina-biotina (LSAB) durante 10 min a temperatura ambiente.

7) Finalmente se efectuó el revelado con diaminobencidina al 0.05% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) y peróxido de hidrógeno al 0.01%. Posteriormente, las secciones fueron teñidas ligeramente con hematoxilina.

El análisis de todas las muestras se acompañó en todos los casos de controles negativos y positivos. Para el análisis de MGMT el control positivo empleado fue tejido hepático humano, para p53 carcinoma de colon humano, mientras que para Ki-67 y p16 se empleó tejido de amígdala. Los controles negativos se efectuaron omitiendo el anticuerpo primario.

La lectura e interpretación de los resultados se efectuó de forma cuantitativa para Ki-67 y semi-cuantitativa para MGMT, por dos observadores independientes.

El análisis de los resultados de Ki-67 se realizó mediante el cálculo de un índice de celularidad positiva a partir de la cuantificación de células Ki-67 positivas de un total de 1000 núcleos en el campo que presentara mayor número de células inmunoreactivas. Las células se consideraron positivas para la immunoexpresión de Ki-67 si presentaban tinción nuclear difusa.

Para el análisis de MGMT se evaluaron entre 15 y 20 campos de cada muestra a una magnificación de x400. La valoración de la expresión se hizo de manera semi-cuantitativa estimando para cada muestra la fracción células immunopositivas y de acuerdo a la siguiente escala: menos del 5% de células positivas se consideró negativo, entre 5 y 25% de células positivas se consideró baja expresión, entre 25 y 50% de celularidad positiva se consideró como moderada expresión y si el porcentaje de células positivas era superior al 50% se consideró como alta expresión. Sólo se consideró positiva la célula cuya tinción fuese nuclear y homogénea.

Por último p53 y p16 fueron analizadas de manera cualitativa (inmunoexpresión presente *vs* ausente)

Todo el análisis de las muestras se efectuó sin conocimiento de la información clínica por parte de los observadores.

4.3. ANÁLISIS MEDIANTE PCR ESPECÍFICA PARA LA DETECCIÓN DE METILACIÓN (MSP)

Para realizar el análisis metilación del promotor mediante la técnica de MSP fue necesario efectuar en un primer tiempo el procesado de las muestras para la obtención del ADN tumoral. En un segundo tiempo el ADN problema se sometió a tratamiento con bisulfito con la finalidad de conseguir la conversión química de las citosinas metiladas a uracilo. Finalmente en un tercer tiempo, se realizó el análisis de PCR con cebadores específicos de metilación y de no-metilación.

A continuación se detallan los protocolos de laboratorio seguidos para cada uno de los tiempos.

4.3.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS TUMORALES

El ADN genómico se aisló de las muestras parafinadas o, cuando hubo disponibilidad, del tejido congelado. La extracción del ADN tumoral se efectuó de acuerdo al siguiente protocolo:

1) El primer día se preparó una mezcla con 4ml de solución de extracción (EDTA, Sarkosyl Na, Proteinasa K, RNAasa, Fenol, Cristalizado, Piedras de ebullición, Trizma base, 8-hidroxiquinoleína, Tris 100 nM, pH = 8, β - mercaptoetanol) + 800µg de proteinasa K en polvo (200µg/ml) por muestra. En un mortero previamente enfriado a -80ºC, se trituró el tejido tumoral evitando su descongelación durante todo el proceso y posteriormente se resuspendió en 2ml de la solución.

2) A continuación, se procedió a la incubación de las muestras durante toda la noche a 37ºC con agitación suave.

3) El segundo día, si el producto presentaba aún zonas sólidas, se añadió 1mg de proteinasa K (100µl de la alícuota a 10mg/ml), se incubó a 55ºC durante 1-2hr y posteriormente se añadió 20µl de ARNasa a 10mg/ml incubándose de nuevo durante 1hr a 37ºC en agitación suave.

4) A continuación se efectuó el lavado y la precipitación para lo cual se añadió 3ml de fenol:cloroformo con alcohol de isoamil (24:1), se agitó ligeramente, se centrifugó a 2000rpm durante 2min a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa evitando el fenol y los residuos de la interfase.

5) Esta misma operación se repitió por segunda vez y, tras ello se añadió 200µl de NaCl 5M y 4ml de isopropanol. Tras mezclar adecuadamente, se centrifugó a 3000rpm durante 5min a 4ºC y se desechó el sobrenadante.

6) A continuación se añadieron 10ml de etanol al 70% para eliminar el exceso de sales, y se centrifugó a 3000rpm durante 10min a 4ºC, desechando de nuevo el sobrenadante.

7) Por último se efectuó el secado del sedimentos durante 2min en bomba de vacío, y finalmente se resuspendió en T.E y dejando las muestras en agitación suave a 37ºC durante 12-24hr.

La cuantificación del ADN obtenido se efectuó mediante espectrometría de absorción a 260 y 280nm.

4.3.2. TRATAMIENTO CON BISULFITO DEL ADN TUMORAL

Paso previo e imprescindible para realizar el análisis de metilación del promotor de *MGMT* mediante la técnica de MSP. Dicho tratamiento se efectuó de acuerdo al protocolo descrito en la literatura (Esteller et al., 1999), con algunas modificaciones:

1) En primer lugar se añadió 5.7µl de NaOH 3M a 1.5µg del ADN problema diluido en 50µl de H2O.

2) A continuación se mantuvo en incubación a 37º durante 10-15min.

3) Posteriormente se añadieron 33µl de hidroquinona 20mM y 530µl de bisulfito sódico 4.3M pH5.0. Tras homogeneizar bien la mezcla, se mantuvo en incubación a 50ºC durante un periodo aproximado de 16-17hr.

En una segunda fase se procedió a la purificación y precipitación del ADN modificado. Ello se efectuó utilizando el Kit de DNA Clean-up: www.promega.com. (Wizard-DNA Clean – Up system. Cat# A7280). Para ello se siguieron los siguientes pasos con cada muestra:

1) En primer lugar, se añadió 1ml de resina de purificación de ADN procediendo a continuación al filtrado de la muestra con la ayuda de una columna de vacío o en su defecto simplemente con la ayuda del émbolo de una jeringuilla.

2) A continuación, se lavó con 1ml de isopropanol al 80% dos veces consecutivas, para arrastrar cualquier resto que pudiera haber quedado en el eppendorf y se procedió al centrifugado durante 2min a 12700rpm. El resultado se traspasó a un nuevo eppendorf añadiendo al mismo 50µl de agua estéril.

3) Transcurridos 5min, se procedió de nuevo a centrifugar durante 1min a 12700rpm obteniéndose así finalmente el ADN eluído.

La última fase del proceso consistió en la precipitación del ADN modificado. Para ello:

1) Se añadió 5.7µl de NaOH 3M a cada muestra incubándose posteriormente durante 15-20min a 37ºC completándose de esta manera la conversión química de C a U.

2) A continuación, se añadió 1µl de glucógeno 10mg/ml y 17µl de AcNH4 10M.

3) Las muestras fueron a continuación precipitadas con 450µl de etanol absoluto frío, agitadas por inversión e incubadas a -80ºC durante toda la noche.

4) Posteriormente se procedió al centrifugado durante 30min a 13000 rpm a 4ºC desechando el sobrenadante.

5) Tras lavar con 400µl etanol 70% frío se procedió nuevamente al centrifugado de las muestras en las mismas condiciones desechando de nuevo el sobrenadante.

6) Finalmente, el pellet convenientemente secado y resuspendido en 50µl de agua, constituyó la muestra sobre las que se realizó la PCR.

4.3.3. PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN

Para la PCR se partió de 2µl de ADN a 25ng/µl. Las secuencias de los cebadores para la reacción de no metilación fueron 5´-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3´, (a favor de sentido) y 5´- AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA3´, (en contra de sentido), y para la reacción de metilación fueron 5´-TTTCGACGTTCGTAGGTTTTCGC-3´, (a favor de sentido) y 5´-CGACTCTTCCGAAAACGAAACG-3´ (en contra de sentido) (Esteller et al., 2000). La temperatura de anillamiento de la reacción fue de 59ºC.

Todas las reacciones se realizaron por duplicado para excluir amplificaciones inespecíficas. Como control positivo de metilación se utilizó ADN placentario tratado *in vitro* con SssI metiltransefrasa (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), y como control negativo ADN procedente de linfocitos normales.

Finalmente, 10µl del resultado obtenido de cada PCR se cargó directamente en un gel no desnaturalizante de polyacrylamida al 8%, y se visualizó bajo luz ultravioleta tras ser teñido con bromuro de etidio.

En cada PCR se incluyeron como controles muestras sin ADN.

Del mismo modo que en el análisis inmunohistoquímico, los investigadores que realizaron la lectura de los geles lo hicieron a ciegas de la información clínica de los pacientes cuyas muestras estaban siendo analizadas.

4.4. ANALISIS ESTADÍSTICO

La relación entre la expresión de MGMT y el estado de metilación del promotor de *MGMT*, así como la relación de ambas con las variables clinicopatológicas analizadas, se evaluó mediante el test de Ji-cuadrado ($\chi 2$) o test exacto de Fisher.

El influencia pronóstica de cada una de las variables en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión fue evaluada en análisis uni y multivariados.

La supervivencia global se determinó mediante cuantificación del periodo de tiempo transcurrido desde el momento de la intervención quirúrgica que confirmó el diagnóstico de glioma anaplásico, hasta la fecha de la última visita o hasta el éxitus del paciente. La supervivencia libre de progresión/recidiva fue cuantificada desde el momento de la intervención quirúrgica que confirmó el diagnóstico, hasta la fecha de recidiva o progresión clínica y/o radiológica.

Para el análisis univariante se construyeron curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier y se efectuó comparación de las mismas mediante el test de Log-rank. Las variables incluidas en el análisis fueron demográficas (edad y género), clínicas (estado funcional valorado mediante la escala de Karnofsky), patológicas (presencia de componente oligodendroglial en el análisis histológico e índice de proliferación celular), radiológicas (presencia de captación anular en las pruebas de neuroimagen) y terapéuticas (grado de resección quirúrgica, tratamiento quimioterápico), además de la expresión de MGMT y del estado de metilación del promotor de *MGMT*. Las variables cuantitativas continuas se expresaron en forma de mediana y rango, siendo la mediana el punto de corte seleccionado para la comparación de las curvas de supervivencia (Tabla I.1).

Para optimizar el análisis estadístico, los resultados de la inmunohistoquímica fueron reclasificados a fin de transformar la variable en dicotómica. Para ello se agruparon bajo el epígrafe “positivos” aquellos tumores con inmunoexpresión baja, moderada o alta.

Tabla I.1: Variables incluidas en el análisis estadístico

Variables		
Demográficas	Edad	≤48a *vs* >48a
	Género	Hombre *vs* Mujer
Clínicas	KPS postoperaorio	≥80 *vs* <80
Patológicas	Componente oligodendroglial	Si *vs* No
	Ki-67	≤4.8% *vs* >4.8%
Radiológicas	Captación anular	No *vs* Si
Terapéuticas	Resección completa	Si *vs* No
	Quimioterapia	Si *vs* No
Moleculares	Expresión de MGMT	Negativa *vs* Positiva
	Estado de metilación del promotor de *MGMT*	Metilado *vs* No metilado

Las variables con un nivel de significación P<0.2 en el análisis univariante, fueron seleccionadas para su inclusión en el análisis multivariante según el modelo de riesgos proporcionales de Cox, para identificar factores pronósticos independientes.

A efectos de minimizar la posibilidad de sesgo, aquellos pacientes que no siguieron de manera rigurosa el protocolo terapéutico establecido no se excluyeron del análisis (Montori y Guyatt, 2001). Por ello, los análisis uni y multivariantes se realizaron para toda la serie en primera instancia (n=93, análisis basado en intención de tratamiento) y posteriormente para el subgrupo de pacientes que recibieron quimioterapia (n=72).

Todo el análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS Inc. para Windows versión 11.0 (SPSS,Inc., Chicago, IL, EUA) y a un nivel de significación de P=0.05.

5. RESULTADOS

Las principales características clínicas, radiológicas y patológicas de los casos que constituyen la serie se muestran en la Tabla I.2. Sesenta de los pacientes (64.5%) fueron hombres, la mediana de edad fue de 48 años (rango, 16-74) y 62 pacientes (66.7%) fueron sometidos a cirugía resectiva (en 34 de ellos se consiguieron resecciones completas mientras que en 28 casos sólo se alcanzó una resección parcial). En 31 casos (33.3%), debido a las características radiológicas de la lesión en relación a su localización o a características clínicas del paciente, la intención del acto quirúrgico fue simplemente la obtención de una biopsia. Setenta y cinco pacientes (80.6%) fueron diagnosticados de astrocitoma anaplásico, mientras que 18 (19.4%) fueron diagnosticados de gliomas anaplásicos con componente oligodendroglial (4 oligodendroglioma anaplásico y 14 oligoastrocitoma anaplásico).

Todos los pacientes recibieron radioterapia postoperatoria sin embargo, en 21 casos (22.6%), no se administró tratamiento quimioterápico por progresión de la enfermedad o deterioro clínico durante el tratamiento radioterápico (en 19 casos), o por negativa del paciente (en 2 casos).

Tabla I.2. Características clínicas, radiológicas y patológicas de la serie

	Variable	n (%)	
Clínicas	Edad	Mediana 48 años (rango 16-74)	
	KPS	Mediana 80 (rango 40-100)	
	Género		
	Hombres	60 (64.5)	
	Mujeres	33 (35.5)	
Anatomopatológicas	Histología		
	AA	75 (80.6)	
	OA	4 (4.4)	
	OAA	14 (15)	
	P53		
	Negativo	31 (33.4)	
	Positivo	48 (51.6)	
	No disponible	14 (15)	
	P16		
	Negativo	25 (26.8)	
	Positivo	53 (57)	
	No disponible	15 (16.2)	
	Ki-67		
	0-4.8%	48 (51.6)	
	> 4.8%	45 (48.4)	
Radiológicas	Captación		
	No	24 (25.8)	No: 24 (25.8)
	Difusa	34 (36.6)	Si: 69 (74.2)
	Anular	35 (37.6)	
Terapéuticas	Cirugía		
	Biopsia	31 (33.3)	Parcial + biopsia 59 (33.4)
	Resección parcial	28 (30.1)	Completa 34 (36.4)
	Resección completa	34 (36.6)	
	Quimioterapia		
	Si	72 (77.4)	
	No	21 (22.6)	
	Respuesta a la radioterapia		
	Completa	6 (6.5)	
	Parcial	3 (3.2)	
	Estabilización	53 (57)	
	Progresión	24 (25.8)	
	No disponible	7 (7.5)	
	Respuesta a la quimioterapia		
	Si	39 (41.9)	
	No	28 (30.1)	
	No valorable	26 (28)	

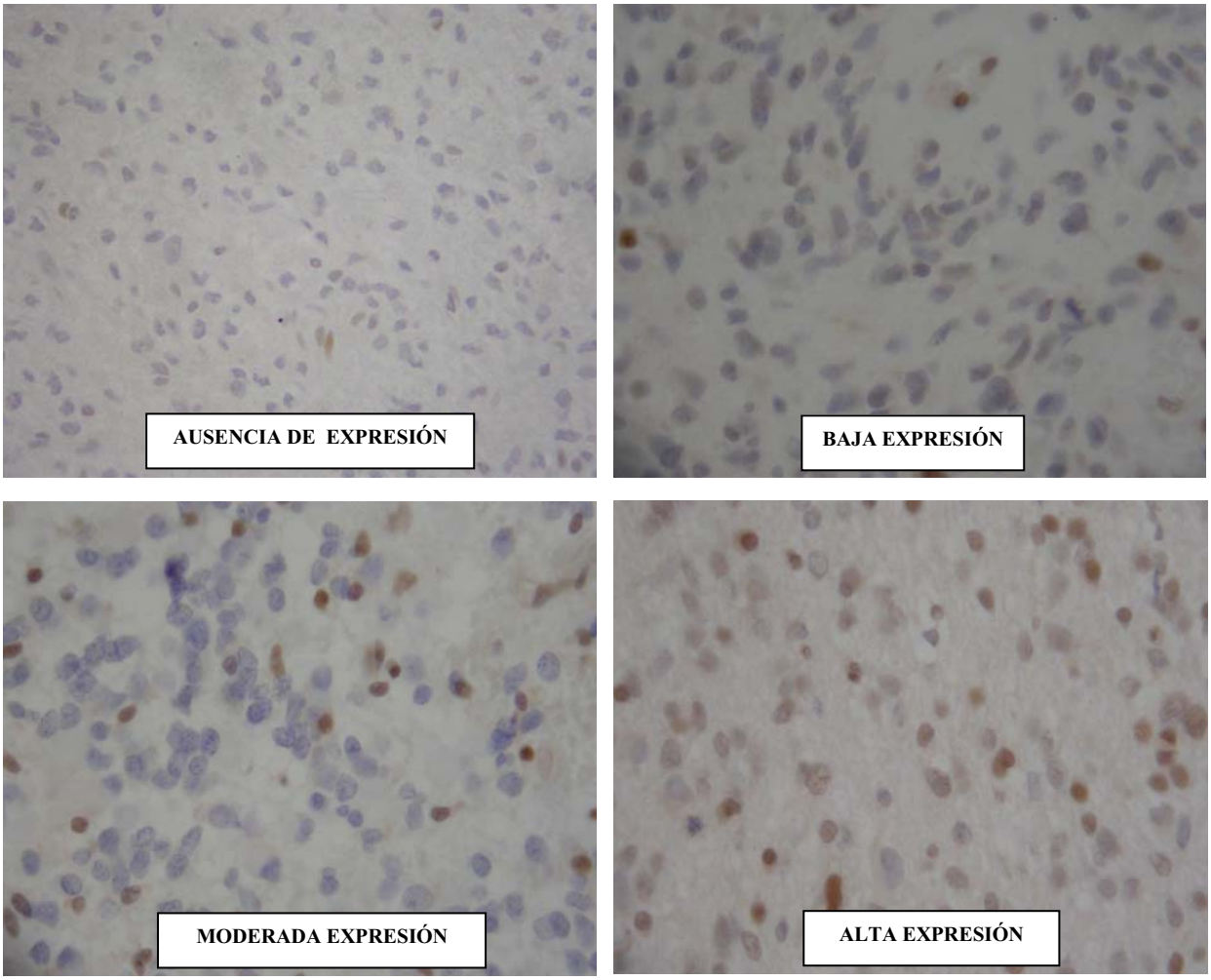
Moleculares	MSP (n = 40)		
	No metilados	20 (50)	
	Metilados	20 (50)	
	MGMT IHQ		
	0: negativo	42 (45.1)	Negativo: 42 (45.2)
	1: leve	19 (20.4)	
	2: moderada	20 (21.5)	Positivo: 51 (54.8)
	3: alta	12 (13)	
Evolución	Progresión post-tratamiento		
	Si	59 (63.4)	
	No	34 (36.6)	
	Status a fin del estudio		
	Fallecidos	64 (68.8)	
	Vivos	28 (30.1)	
	Perdidos	1 (1.1)	

5.1. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MGMT Y EL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *MGMT*

Se detectó immunoexpresión de MGMT en 51 tumores (54.8%). De ellos, 19 mostraron baja expresión, 20 mostraron expresión moderada y en 12 casos se observó expresión alta de la proteína.

En todos los casos en los que se detectó expresión de la proteína, la expresión fue heterogénea, alternando en el seno de la misma muestra, áreas con ausencia completa de expresión de MGMT con otras áreas que mostraban agrupaciones celulares o células aisladas intensamente positivas (Figura I.1.)

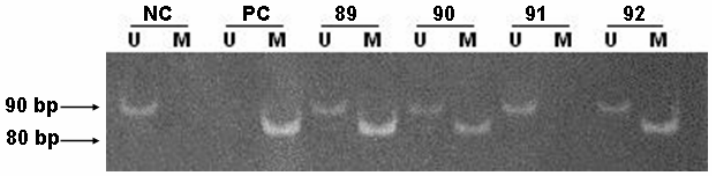
Figura I.1. Inmunoexpresión de MGMT



En cuanto al estado de metilación del promotor de *MGMT*, se consiguió una correcta amplificación del ADN y un resultado concluyente en 40 muestras. Los casos correspondientes a estas muestras no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables de estudio con respecto al resto de los pacientes de la serie. Se detectó presencia de hipermetilación del promotor en 20 de las 40 muestras (50%).

Curiosamente, en todos los casos en los que se amplificó la banda de metilación también se obtuvo amplificación de la banda de no-metilación (Figura I.2.), es decir todos los tumores que mostraban promotor metilado mostraban también la presencia de no-metilación.

Figura I.2.



NC: Control Negativo
PC: Control Positivo
U: Banda de No-Metilación
M: banda de Metilación

Gel de poliacrilamida al 8% y productos de la MSP. Las muestras 89, 90 y 92 muestran amplificación de las bandas de no-metilación y de metilación mientras que la muestra número 91 sólo presenta amplificación de la banda de no-metilación

Como puede observarse en la Tabla I.3., cuatro de los tumores analizados mostraron ausencia de expresión de la proteína MGMT e hipermetilación del promotor de *MGMT*, mientras que 13 tumores con promotor no-metilado mostraron immunoreactividad positiva en mayor o menor grado.

Por el contrario, 16 de los casos analizados mostraron hipermetilación del promotor y simultáneamente expresión de proteína, mientras que en siete tumores se observó ausencia completa de immunoreactividad para MGMT en las células tumorales y ausencia de hipermetilación del promotor.

Tabla I.3.

	No-metilado	Metilado	
IHQ Positiva	13	16	29
IHQ Negativa	7	4	11
	20	20	40

No se halló por tanto una asociación estadísticamente significativa entre presencia de expresión immunohistoquímica de la proteína MGMT y ausencia de metilación del promotor de *MGMT*, ni tampoco entre la ausencia de expresión de la proteína y la presencia de metilación del promotor (P = 0.29). Es decir, los resultados de la presente serie no corroboran, en contra de lo previsible, la existencia de una asociación firme entre metilación del gen y ausencia de expresión de la proteína.

5.2. CORRELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE MGMT Y/O METILACIÓN DE *MGMT* Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS

En lo que se refiere a las variables clínico-patológicas analizadas, no se hallaron tampoco diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína o el estado de metilación del promotor en relación a ninguna de las variables analizadas a excepción del género, ya que los varones mostraron una mayor incidencia de tumores con promotor no-metilado (P=0.004) (Tabla I.4.).

Tabla I.4. Características clinicopatológicas de los pacientes; relación con la expresión de MGMT y el estado de metilación del promotor.

Variable	Immunoexpresión de MGMT (n = 93)					Estado de metilación del promotor de *MGMT* (n = 40)				
	Positivos (n = 51)		Negativos (n = 42)		*P*	Metilado (n = 20)		No-Metilado (n = 20)		*P*
	n	%	n	%		n	%	n	%	
Edad										
≤ 48 a	30	58.8	17	40.5	0.078	11	55	14	70	0.327
> 48 a	21	41.2	25	59.5		9	45	6	30	
Género										
Hombres	30	59.0	30	71.4	0.206	7	35	16	80	0.004*
Mujeres	21	41.0	12	28.6		13	65	4	20	
KPS postoperatorio										
< 80	17	33.4	21	50.0	0.104	9	45	4	20	0.091
≥ 80	34	66.6	21	50.0		11	55	16	80	
Histología										
AA	41	80.4	34	81.0	0.946	18	90	14	70	0.235
OA, OAA	10	19.6	8	19.0		2	10	6	30	
Ki-67										
≤ 4.8 %	30	59.0	18	43.0	0.125	12	60	12	60	1.000
> 4.8 %	21	41.0	24	57.0		8	40	8	40	
Captación de contraste										
No	32	62.7	26	62.0	0.934	10	50	15	75	0.102
Sí	19	37.3	16	38.0		10	50	5	25	
Grado de resección										
Resección completa	20	39.2	14	33.4	0.558	9	45	8	40	0.749
Res. subtotal o biopsia	31	60.8	28	66.6		11	55	12	60	
Quimioterapia										
Si	42	82.4	30	71.4	0.210	16	80	20	100	0.106
No	9	17.6	12	28.6		4	20	0	0	

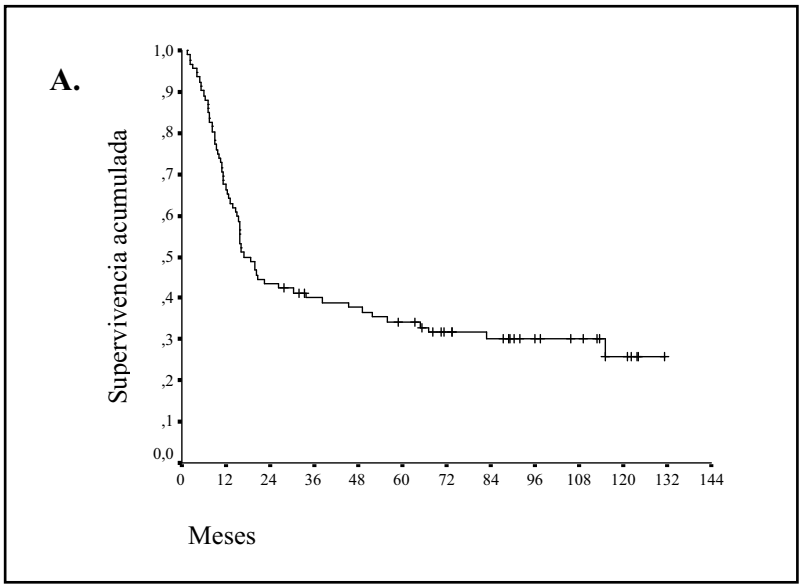
AA, astrocitoma anaplásico; OA, oligodendroglioma anaplásico; OAA, oligoastrocitoma anaplásico

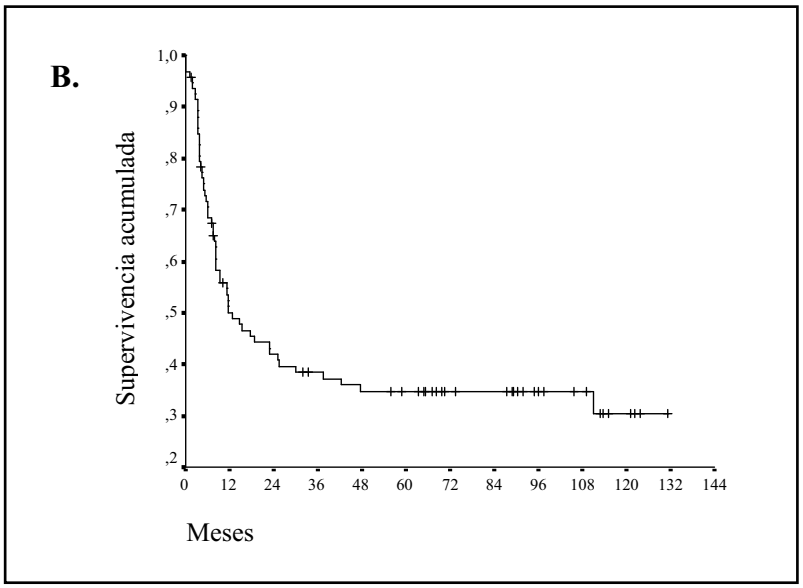
5.3. VALOR PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DE MGMT Y DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR

5.3.1. SUPERVIVENCIA GLOBAL

Tras una mediana de seguimiento de 89.7 meses (rango, 28-131), 28 pacientes (30.1%) permanecían vivos. La mediana de supervivencia fue de 18 meses (rango, 1.6-131) (Figura I.3.).

Figura I.3. Curva de Kaplan-Meier para toda la serie (n=93) A: Supervivencia global, B: Supervivencia libre de progresión





En un primer análisis basado en intención de tratamiento, y en el que se incluyeron por lo tanto todos los pacientes de la serie (n = 93), los factores que demostraron influencia pronóstica en términos de supervivencia global en el análisis univariante fueron: la edad, el estado funcional postoperatorio determinado por la puntuación por la escala de Karnofsky, el índice de proliferación celular (Ki-67), la presencia de captación de contraste en la RM y el grado de resección, mientras que el componente oligodendroglial en el tumor sólo mostró una tendencia hacia la significación estadística.

Cuando estas variables con significación estadística se introdujeron en el modelo multivariante fueron el estado funcional postoperatorio (KPS≥80), el índice de proliferación celular (Ki-67≤4.8%), la ausencia de captación de contraste en la neuroimagen preoperatoria y la resección completa las variables que resultaron factores pronósticos independientes de mayor supervivencia global. La ausencia de immunoexpresión de MGMT mostró únicamente una tendencia hacia la significación estadística en el modelo de Cox (Tabla I.5.).

En un segundo análisis se incluyó sólo el subgrupo de pacientes que realmente recibieron tratamiento quimioterápico (n=72). En este caso, la ausencia de expresión de MGMT resultó ser factor pronóstico independiente de supervivencia global en el análisis multivariante, junto con el KPS postoperatorio≥80, el índice de proliferación celular (Ki-67≤4.8%), y la resección completa (Tabla I.6.) (Figura I.4.).

El estado de metilación del promotor determinado por MSP no resultó ser factor pronóstico de supervivencia global ni en toda la serie ni en el subgrupo de pacientes tratados con quimioterapia.

Tabla I.5. Factores pronósticos de supervivencia global en la serie completa (n=93)

Variable	Análisis Univariante			Analisis Multivariante		
	Hazard Ratio#	95% IC	*P*	Riesgo Relativo	95% IC	*P*
Edad						
≤ 48 a	2.204	1.328 - 3.658	0.002*	--	--	n.s
> 48 a	1§					
KPS postoperatorio						
≥ 80	3.444	2.090 - 5.677	0.000*	3.066	1.825 - 5.153	0.000*
< 80	1§			1§		
Componente oligodendroglial						
Si	1.806	0.915 - 3.567	0.089	--	--	n.s
No	1§					
Ki-67						
≤ 4.8 %	3.359	1.978 - 5.705	0.000*	3.198	1.820 - 5.620	0.000*
> 4.8 %	1§			1§		
Captación anular de contraste						
No	2.475	1.498 - 4.089	0.000*	2.122	1.270 - 3.547	0.004*
Si	1§			1§		
Resección completa						
Si	2.906	1.636 - 5.161	0.000*	3.024	1.655 - 5.525	0.000*
No	1§			1§		
Expression de MGMT						
Negativa	1.192	0.729 - 1.947	0.484	1.666	0.968 - 2.868	0.066*
Positiva	1§			1§		
Estado del promotor de *MGMT*						
Metilado	1.469	0.657 - 3.283	0.349	--	--	n.s
No-Metilado	1§					

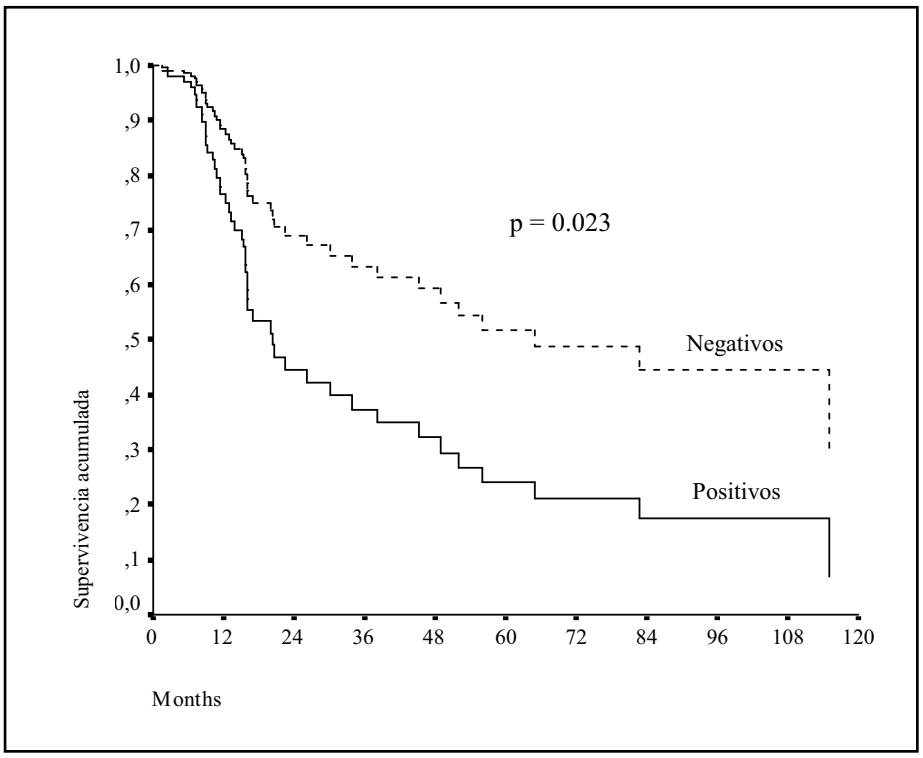
Razón de riesgo de estar vivo; IC, Intervalo de confianza; § Grupo de referencia ,* Resultado con significación estadística

Tabla I.6. Factores pronósticos de supervivencia global en el subgrupo de pacientes que recibieron quimioterapia (n = 72)

Variable	Análisis Univariante			Análisis Multivariante		
	Hazard Ratio#	95% IC	*P*	Riesgo Relativo	95% IC	*P*
Edad						
≤ 48 a	2.189	1.221 - 3.924	0.009*	--	--	n.s
> 48 a	1§					
KPS postoperatorio						
≥ 80	2.924	1.641 - 5.209	0.000*	2.454	1.346 - 4.473	0.003*
< 80	1§			1§		
Componente oligodendroglial						
Si	2.220	0.986 - 4.996	0.054	2.275	0.957 - 5.433	0.064
No	1§			1§		
Ki-67						
≤ 4.8 %	3.989	2.127 - 7.481	0.000*	3.761	1.889 - 7.487	0.000*
> 4.8 %	1§			1§		
Captación anular de contraste						
No	2.343	1.296 - 4.233	0.005*	1.844	0.981 - 3.466	0.057
Si	1§			1§		
Resección completa						
Si	2.831	1.483 - 5.404	0.002*	3.918	1.947 - 7.881	0.000*
No	1§			1§		
Expresión de MGMT						
Negativa	1.057	0.595 - 1.880	0.849	2.121	1.107 - 4.065	0.023*
Positiva	1§			1§		
Estado del promotor de *MGMT*						
Metilado	1.333	0.565 - 3.143	0.512	--	--	n.s
No-Metilado	1§					

Razón de riesgo de estar vivo; IC, Intervalo de confianza; § Grupo de referencia

Figura I.4.: Curva de Kaplan-Meier. Supervivencia global en el subgrupo de pacientes tratados con quimioterapia (n = 72) en función de la expresión de MGMT por IHQ.



5.3.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN

Al final del seguimiento, 34 pacientes (36.6%) permanecían libres de progresión. Los factores que en el análisis univariante se relacionaron de manera estadísticamente significativa con la supervivencia libre de progresión fueron la edad, el KPS postoperatorio, el índice de proliferación celular, la presencia de componente oligodendroglial, la ausencia de captación de contraste en la RM, y el grado de resección.

Tal como puede observarse en la Tabla I.7., en el análisis multivariante fueron el KPS$\geq$80, la presencia de componente oligodendroglial, el índice de proliferación celular (Ki67$\leq$4.8%), la ausencia de captación de contraste en la RM y la resección completa, los factores independientes de supervivencia libre de progresión de la serie completa.

En el subgrupo de pacientes tratados con quimioterapia, la immunoexpresión de MGMT no se asoció de manera independiente a la supervivencia libre de progresión (Tabla I.8.).

Tabla I.7. Factores pronósticos de supervivencia libre de progresión en la serie completa (n=93)

Variable	Análisis Univariante			Análisis Multivariante		
	Hazard Ratio#	95% IC	*P*	Riesgo Relativo	95% IC	*P*
Edad						
≤ 48 a	1.947	1.138 - 3.333	0.015*	--	--	n.s
> 48 a	1§					
KPS postoperatorio						
≥ 80	2.723	1.601 - 4.631	0.000*	2.399	1.380 - 4.170	0.002*
< 80	1§			1§		
Componente oligodendroglial						
Sí	2.771	1.184 - 6.484	0.019*	3.044	1.211 - 7.653	0.018*
No	1§			1§		
Ki-67						
≤ 4.8 %	3.448	1.961 - 6.063	0.000*	3.016	1.684 - 5.403	0.000*
> 4.8 %	1§			1§		
Captación anular de contraste						
No	2.701	1.578 - 4.622	0.000*	1.842	1.047 - 3.242	0.034*
Si	1§			1§		
Resección completa						
Si	2.559	1.405 - 4.661	0.002*	3.146	1.657 - 5.975	0.000*
No	1§			1§		
Expresión de MGMT						
Negativa	1.179	0.697 - 1.995	0.538	--	--	n.s
Positiva	1§					
Estado del promotor de *MGMT*						
Metilado	1.485	0.641 - 3.439	0.850	--	--	n.s
No-Metilado	1§					

Razón de riesgo de estar vivo; IC, Intervalo de confianza; § Grupo de referencia

Tabla I.8. Factores pronósticos de supervivencia libre de progresión en el subgrupo de pacientes que recibieron quimioterapia (n=72)

Variable	Análisis Univariante			Análisis Multivariante		
	Hazard ratio#	95% IC	*P*	Riesgo Relativo	95% IC	*P*
Edad						
≤ 48 a	1.868	1.012 - 3.451	0.046*	--	--	n.s
> 48 a	1§					
KPS postoperatorio						
≥ 80	2.269	1.224 - 4.205	0.009*	--	--	n.s
< 80	1§					
Componente oligodendroglial						
Si	3.644	1.294 - 10.258	0.014*	5.339	1.806 – 15.779	0.002*
No	1§			1§		
Ki-67						
≤ 4.8 %	3.886	2.022 -7.471	0.000*	3.766	1.942 – 7.302	0.000*
> 4.8 %	1§			1§		
Captación anular de contraste						
No	2.785	1.496 - 5.186	0.001*	--	--	n.s
Si	1§					
Resección completa						
Si	2.388	1.232 - 4.627	0.010*	4.049	1.999 – 8.201	0.000*
No	1§			1§		
Expresión de MGMT						
Negativa	1.050	0.570 - 1.936	0.875	--	--	n.s
Positiva	1§					
Estado del promotor de *MGMT*						
Metilado	1.317	0.535 - 3.243	0.550	--	--	n.s
No-Metilado	1§					

Razón de riesgo de estar vivo; IC, Intervalo de confianza; § Grupo de referencia

6. DISCUSIÓN

6.1. RELACIÓN ENTRE METILACIÓN DEL PROMOTOR Y EXPRESIÓN DE LA PROTEINA

La proporción de tumores que en nuestra serie mostraron inmunoreactividad positiva o hipermetilación del promotor fue superponible a la de otras series de la literatura (Esteller et al., 1999).

Al evaluar la asociación entre los resultados de la IHQ y de la MSP, es decir, la asociación entre la existencia de promotor metilado y la expresión de proteína, se halló una relación inconsistente entre ambas.

Además, aquellos tumores considerados con inmunoreactividad positiva, mostraron una clara heterogeneidad en la expresión de MGMT, presentando áreas con ausencia completa de expresión alternando con otras zonas de alta inmunorreactividad.

En cuanto al análisis de metilación del promotor, se halló hipermetilación en 20 casos, observándose en todos ellos una amplificación simultánea de la banda de no metilación.

Se observó por tanto la presencia de metilación del promotor en algunos tumores que mostraban expresión de proteína, y a la inversa, es decir, ausencia completa de inmunoreactividad en las células tumorales de algunos tumores cuyo promotor se mostró como no-metilado en la MSP.

En lo que respecta a la correlación entre la metilación del promotor de *MGMT* y la expresión de la proteína, los trabajos publicados hasta la fecha que han evaluado explícitamente este aspecto tanto en gliomas como en metástasis cerebrales o neoplasias de otros órganos de la economía sistémica, muestran resultados contradictorios (Baeza et al., 2003; Cameron et al., 1999; Lenz et al., 2004) (Tabla I.9.).

Tabla I.9. Correlación entre metilación del promotor de *MGMT* y expresión de la proteina MGMT en series de la literatura

Autor / año	n / histología	Método para metilación (% de resultados válidos)	Método para IH	Correlación estadísticamente significativa
		Tumores cerebrales		
Cao et al., 2009	73 GB	MSP	MT3.1 (Abcam, Cmmabridge, England)	no
Metellus et al., 2009	22 GB	MSP	MT 3.1 (Chemicon International, Temecula Ca, EUA)	si
Sonoda et al., 2009	39 GB	MSP	MT 3.1 (Chemicon International, Temecula Ca, EUA)	si
Kuo et al., 2009	36 GBG 13 GA	MSP	MT3.1 (Lab -Vsion Corporation)	no
McCormack et al., 2009	46 adenomas de hipófisis	MSP	Clone MT23.2, MA3-16537, Affinity Bioreagents CO EUA	si
Nakagawa et al., 2009	11 GB	MSP	Ac monoclonal MAB16200, Chemicon, Temecula, Ca, EUA)	si
Preusser at al., 2008	122 GB	MSP	MT3.1 (Dako, Copenhagen, Denmark) y MT23.2 (Zymed lab., Carlsbad, Ca, EUA)	no
Sasai et al., 2008	15 GB 5 GA 1 GBG	MSP (85%)	Ac monoclonal de ratón MT 3.1 (Chemicon International, Temecula Ca, EUA)	no
Yachi et al., 2008	25 GB 7 líneas celulares	MSP Secuenciación del promotor	Ac monoclonal MT 3.1 (Chemicon, Millpore Corporation)	no
Buccoliero et al., 2008	12 ependimomas anaplásicos	MSP (75%)	Ac Ab1; clon MT3.1 (NeoMarkers, Lab-Vision Corporation)	si
Parkinson et al., 2008	10 GB	MSP (90.9%) Secuenciación	Ac monoclonal de ratón Clone MT23.2 (Affinity Bioreagents CO, EUA)	si
Rodríguez et al., 2008	50 GB	MSP (78%)	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	no
Jeuken et al., 2007	14 GB 11 GA 8 GBG	MSP y MS-MLPA[1]	Ac monoclonal (Chemicon, hampshire S053 4NF, UK)	no
Grasbon-Frodl et al., 2007	18 GB 7 AA	MSP (100%) Secuenciación	Ac monoclonal de ratón MT 3.1 (Dako)	no
Lavon et al., 2007	9 GA 14 GBG	MSP	Ac monoclonal MAB16200, Chemicon, Temecula, Ca, EUA)	no
Lázcoz et al.,	12 líneas cel.	MSP	RT-PCR	no

2007	de neuroblastoma		semicuantitativa	
Cankovic et al., 2007	80 GB 43 GA 40 GBG	MSP (98%)	Ac monoclonal de ratón MT 23.2 (Invitrogen, Carslbad, CA, EUA)	si
Maxwell et al, 2006	22 GB 10 GA	MSP modificada (ratio AGT/ ß-actina) (96.8%)	Ac monoclonal MT 3.1	no
Chu et al., 2006	11 linfoma primario del SNC	Nested MSP	Mouse monoclonal MT3.1, MS-470 ; Lab Vision Corporation)	si
Brell et al., 2005	93 GA	MSP (45%)	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	no
Mölleman et al, 2005	20 GA 32 GBG	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	no
Rood et al., 2004	32 meduloblastoma	MSP (100%)	Ac clon mT3.1 (Chemicon International, Temecula Ca, EUA)	no
Yin et al., 2003	51 gliomas	MSP	RT-PCR	si
Esteller et al., 1999	8 gliomas	MSP	Ac. Monoclonal d eratón (N99200, Novus Molecular Inc., San Diego, EUA)	si
Metástasis cerebrales				
Ingold et al., 2009	178 metástasis cerebrales	MSP modificada (nested PCR) (61.2%)	Ac clon mT3.1 (Chemicon International, Temecula Ca, EUA)	si
Otros tumores				
Kim et al., 2009	62 sarcomas de partes blandas	MSP (100%)	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	si
Rimel et al., 2009	141 ca. ovárico y de endometrio	COBRA	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (DakoCytomation, Inc, CA, EUA)	si
Kuester et al., 2009	133 esófago de Barret y adenoca.	MSP	Ac monoclonal de ratón MT 23.2 (Zymed Lab. In.c., San Francisco CA, EUA)	si
Zhang et al., 2008	24 ca. colorrectal	MSO	--	si
Voelter et al., 2008	37 metástasis hepáticas de melanoma uveal	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	no
Martin et al., 2008	36 discrasias de células plasmáticas	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (DakoCytomation, Inc, CA, EUA)	--[2]
Nagasaka et al., 2008	233 ca. colorrectal	COBRA[3] y secuenciación	Ac monoclonal MT3.1 (PharMingen, Fremont,	si

	104 poliposis adenomatosa		CA, EUA)	
Rietschel et al., 2008	8 melanoma	MS Pirosecuenciación	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (Kamiya Biomedical Co,WA, EUA)	si
Herath et al., 2007	61 ca. hepatocelular	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	no
Mikami et al., 2007	153 tumores asociados a colitis ulcerosa	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	si
Ogawa et al., 2006	34 ca. colorectal	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	si
Baumann et al., 2006	132 adenoca. esofágo	RT-MSP	Ac monoclonal Ab1; (Lab-Vision, Westinghouse)	si
Kawaguchi et al., 2006	50 sarcomas de partes blandas	MSP	Ac. Monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, EUA)	si
Martin et al., 2006	20 gammapatías monoclonales	MSP (100%)	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (DakoCytomation, Inc, CA, EUA)	si
Fox et al., 2006	110 ca. colorectal	MSP (100%)	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	si
Munot et al., 2006	18 ca. mama	MSP	MGMT Pharmigen, Ox, UK	si
Shen et al., 2005	24 ca. colorrectales esporádicos	MSP	Ac monoclonal MAB16200 (Chemicon International, Temecula Ca, EUA)	si
Koga et al., 2005	37 ca. tracto biliar	MSP	Ac polyclonal de conejo (G168-728; PharMingen, San Diego, CA, EUA)	si
Qi et al., 2005	89 tumores colorectales	MSP	Mouse anti-MGMT monoclonal AB	si
Lin et al., 2005	47 ca. escamoso cervix 20 adenoca. cervix	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	no
Furonaka et al., 2005	123 ca. pulmón	MSP	Ac monoclonal MT 3.1 (DakoCytomation, Denmark)	si
Kohonen-Corish et al., 2005	176 ca. colon	MSP (98.9%)	Clone MT5.1, BD Pharmigen 557045	si
Zuo et al., 2004	93 ca. escamoso cabeza y cuello	MSP	Ac. Monoclonal (Novas Biologicals, Littleton, CO)	si

Rossi et al., 2004	28 linfomas B	MSP	Ac monoclonal de MT3.1 (Chemicon Intl., Temecula, CA, EUA)	si
Kang et al., 2004	37 ca próstata 14 PINs 20 tejido prostático normal	MSP	Ac monoclonal (Chemicon, Temecula, CA, EUA)	si
Brock et al., 2003	14 adenoca. esófago	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (Chemicon, Temecula, CA, EUA)	si
Nagasaka et al., 2003	45 ca. colorrectales	MSP	Ac monoclonal MT3.1 (PharMingen, Fremont, CA, EUA)	si
Zhang et al., 2003	21 ca. escamoso esofágo	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	si
Zhang et al., 2003	83 ca. hepatocellular	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	si
Kim et al., 2003	265 adenomas y ca. colorrectales	MSP	Ac monoclonal de ratón (Chemicon International, Temecula Ca, EUA)	si
Matsukura et al., 2003	46 ca. hepático	Nested MSP	Ac policlonal de conejo	si
Bae et al., 2002	149 ca. gástrico	MSP	Ac monoclonal de ratón (Chemicon International, Temecula Ca, EUA)	si
Choy et al., 2002	23 retinoblastoma	MSP	Ac. 3B8, Inst. Mol.Cell. Biology, Nat.Univ. of Singapore	si
Esteller et al., 2002	26 linfoma B cel. grande	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (Chemicon International, Temecula Ca, EUA	si
Hayashi et al., 2002	87 adenoca. pulmón	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (Chemicon International, Temecula Ca, EUA)	si
Smith-Sørensen et al., 2002	69 ca. testicular	MSP	Ac. Policlonal de cabra sc-8825 (Santa Cruz Biotechnoloy Inc, santa Cruz, Ca, EUA)	no
Park et al., 2001	71 ca. gástrico	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	no
Wolf et al., 2001	19 ca. pulmón no célula pequeña	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	si
Whitehall et al., 2001	80 ca. colorectal	MSP	Ac monoclonal de ratón MT3.1 (NeoMarkers, Fremont, CA, EUA)	si

Herfarth et al., 1999	21 ca. colorectal	Ms-SNu-PE[4]	Western Blot y actividad de la proteína	si

[1] MS-MLPA: "*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*".
[2] datos insuficientes para efectuar el análisis estadístico.
[3] COBRA: *"Combined Bisulfite Restriction Analysis"*.
[4] Ms-SNu-PE: *"Methylation-sensitive Single-nucleotide Primer Extension"*

Parecería por tanto, que algunos tumores pueden carecer de expresión de MGMT en ausencia de metilación del promotor, y del mismo modo, algunos tumores cuyos promotores se muestran metilados podrían expresar la proteína (Maxwell et al., 2006; Sasai et al., 2008). A este respecto, cabe destacar la observación de Zhang et al. (Zhang et al., 2003) corroborada por otros autores entre los cuales nos incluimos, y que hace referencia al hecho de que en el grupo de tumores no metilados, existe una importante variabilidad en la expresión de la proteína, lo que sugiere que al margen de la metilación del promotor deben existir otros factores que influyan en la expresión-actividad final de la proteína.

Mientras que la metilación del promotor parece estar claramente implicada en la inactivación del gen *MGMT* en algunos tipos de neoplasia y en líneas celulares, la regulación de la expresión en otros casos, entre los cuales se encuentran los gliomas, parece ser un fenómeno de mayor complejidad no siendo la hipermetilación del promotor el único factor determinante. Por ello, resulta perfectamente compatible la co-existencia de promotor metilado y una alta expresión de MGMT en el mismo tumor (Bae et al., 2002; Bearzatto et al., 2000; Bhakat y Mitra, 2003; Park et al., 2001; Rood et al., 2004; Smith-Sorensen et al., 2002).

Algunos autores han atribuido esta ausencia de correlación entre metilación del promotor y expresión de la proteina, al hecho de que en las muestras tumorales pueda existir "contaminación" por células no neoplásicas que asienten en el seno de los gliomas y que expresen MGMT, dando lugar a falsos positivos en el análisis inmunohistoquímico.

Esta es sin embargo una excesiva simplificación del problema, ya que tal como se expone en la presente discusión, las verdaderas razones por las cuales no existe una buena correlación entre MSP e IHQ son hasta la fecha desconocidas y se barajan varias hipótesis que a continuación se detallan (Blough et al., 2007; Sasai et al., 2007).

6.1.1. LA METILACIÓN COMO MECANISMO DE INACTIVACIÓN DE UN GEN

Aunque en términos generales se acepta, tal como se ha expuesto previamente, que la metilación de las islas CpG del promotor de un gen implica una inhibición de la transcripción, y por tanto el silenciamiento del mismo, esta afirmación debe matizarse debiéndose hacer las siguientes consideraciones (Jones y Takai, 2001; Turker, 2002).

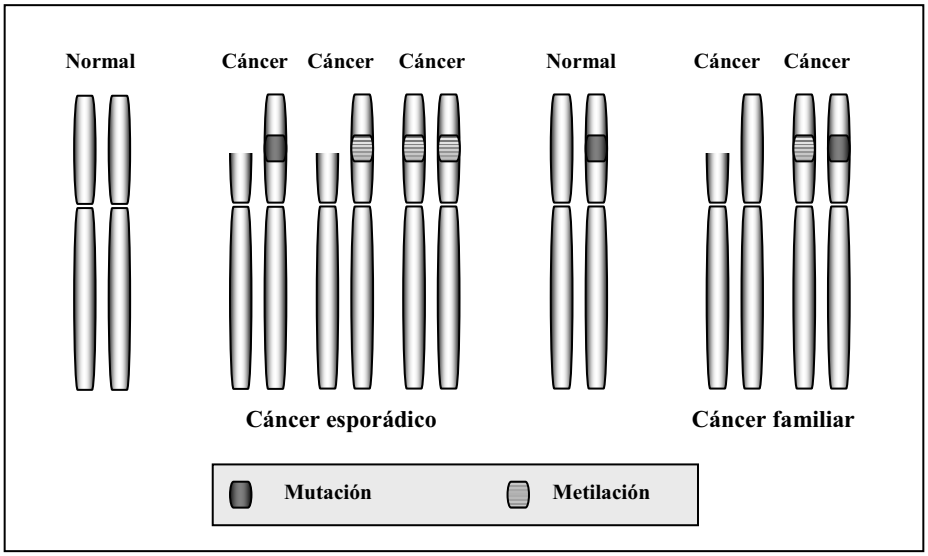
En primer lugar, y según la hipótesis de los dos pasos de Knudson *("Two-Hits Hypothesis")* (Knudson, 2001) para que se produzca la inhibición completa de la función de un gen, se requiere de la pérdida de la función de los dos alelos de dicho gen. Así por ejemplo, los cambios genéticos ocasionados por mutaciones de la línea germinal (en el caso del cáncer familiar) o por mutaciones somáticas (en el caso del cáncer esporádico) afectarían a una de las copias del gen implicado, constituyendo el primer paso de la hipótesis *("first hit").* Sin embargo, para que se produzca una pérdida completa de la función del gen, es necesario que se produzca un segundo paso *("second hit")* que implica generalmente y según la teoría de Knudson, la pérdida somática de la región del cromosoma que contiene la otra copia del gen, es decir, una pérdida de heterocigosidad.

La hipótesis de Knudson ha demostrado ser aplicable a genes supresores y reparadores del ADN y en prácticamente todos los tipos de cancer humano (Jones y Laird, 1999).

En el caso de la MGMT, un fenómeno epigenético como es la metilación del promotor, podría constituir el primer paso de la hipótesis de Knudson (Jones, 2002), siendo consiguientemente necesario un segundo paso para que se produzca la inhibición transcripcional completa (Jones, 1999). Nuevamente, la metilación del promotor del alelo restante puede ser este segundo paso.

De hecho, la hipermetilación de los promotores de ambos alelos de un gen no es un hecho infrecuente en los canceres esporádicos (Herman y Baylin, 2003) (Figura I.5.).

Figura I.5.: Hipótesis de Knudson (Modificada de Herman et al. (Herman y Baylin, 2003))



Así, y al menos en un plano teórico, cabe destacar la posible existencia de una metilación monoalélica, que si bien sería detectable con los test de laboratorio, no sería suficiente para detener por completo la síntesis de MGMT por las células tumorales, lo que justifica por lo tanto que pueda producirse en algunos tumores la co-existencia de promotor metilado según la MSP y expresión inmunohistoquímica de proteina simultáneamente.

Dicho de otro modo, según la teoría de los dos pasos de Knudson es necesario que se produzca metilación aberrante del promotor de un alelo junto con mutación o pérdida de heterocigosidad del otro, o bien, metilación aberrante simultánea de los promotores de ambos alelos para que se origine una inactivación funcional completa del gen *MGMT* (Soejima et al., 2005).

Por ello, la frecuencia con la que la metilación del promotor contribuye o es causa de inactivación funcional de un gen puede variar desde un 9% en el gen *RB1* del retinoblastoma, a un 33% en el gen *VHL* de la enfermedad de von Hipel Lindau y hasta un 84% en el gen *MLH1* de algunos casos de cáncer colorrectal (Jones y Laird, 1999).

En segundo lugar, en algunos genes como *p*16 puede producirse lo que algunos autores han denominado un "cambio en el paradigma" (*"paradigm shift")* consistente en que la hipermetilación de las islas CpG del promotor se asocia paradójicamente a una sobrexpresión del gen y no a un silenciamiento del mismo (Kelavkar et al., 2007; Shaw et al., 2008). Las razones por las que se produce este fenómeno no son conocidas y se especula con la hipótesis de

que quizás en estos casos, la metilación pueda producirse como reacción a la sobrexpresión del gen, esto es, como consecuencia de la misma.

En tercer lugar, el fenómeno de hipermetilación no es el que *per se* causa la interrupción de la transcripción del gen. Además de la hipermetilación del promotor, es necesario que se produzcan otros fenómenos epigenéticos como modificación de histonas y adhesión de ciertas proteínas (H3me2K9, MeCP2) a los lugares metilados, para que suceda la represión transcripcional. Esta unión de proteínas originará un cambio de configuración en la cromatina celular formándose heterocromatina, y es este cambio conformacional de la cromatina lo que impedirá la unión al ADN de los factores de transcripción con el consiguiente silenciamiento del gen (Herman y Baylin, 2003; Soejima et al., 2005).

Este hecho ha podido demostrarse en estudios *in vitro* sobre líneas celulares, en los que se ha observado que es posible conseguir el silenciamiento del gen *MGMT* en ausencia de metilación del promotor (Bhakat y Mitra, 2000; Ma et al., 2008; Nakagawachi et al., 2003; Pieper et al., 1996; Zhao et al., 2005) y a la inversa, es decir, puede observarse metilación del promotor (determinado por MSP) y simultaneamente obtenerse expresión de ARNm detectable por RT-PCR y de proteína detectable por Western Blot (Ueda et al., 2004).

En cuarto lugar, además de la metilación en y/o alrededor del promotor, determinados cambios en el cuerpo del gen pueden resultar igualmente relevantes en la expresión de MGMT. Así, mientras que la metilación de 21 de las 25 islas CpG del promotor se relaciona de manera inversa con la expresión de MGMT, la metilación del cuerpo del gen parece relacionarse de manera directa con la expresión de la misma (Christmann et al., 2001; Costello et al., 1994).

Dicho de otro modo, la metilación selectiva en algunos lugares del promotor suprime la transcripción mientras que la metilación simultánea de otras zonas del gen parece aumentar la misma y por ende la expresión de la proteina. Por todo ello, la ausencia de expresión de MGMT no debería atribuirse exclusivamente a la hipermetilación del promotor, ya que en ella puede influir también la metilación en las regiones adyacentes al mismo (Bhakat y Mitra, 2003; Cameron et al., 1999; Costello et al., 1994; Pieper et al., 1996).

Por último, otro aspecto a considerar es el grado de metilación del promotor, dado que cabe la posibilidad de que la metilación lejos de tratarse de un mecanismo de inactivación total de la transcripción de un gen, pueda también influir de modo gradual (Costello et al., 1994).

Así, la hemimetilación o metilación parcial entendiendo por tal la metilación de un porcentaje inferior al 100% de las islas CpG del promotor (Bello et al., 2004; Qian et al., 1995; Rood et al., 2004; Yachi et al., 2008) y la metilación monoalélica (*vs* bialélica) que ocurriría sólo en un alelo del gen, podrían también explicar porqué se observa en algunos tumores

metilación del promotor y expresión de proteína simultáneamente (Nakagawa et al., 2009; Shaw et al., 2008; Shen et al., 2005). Esta última hipótesis ha sido propuesta por diversos grupos de investigación y corroborada en varias publicaciones:

Rood et al. (Rood et al., 2004) demuestran en una serie de meduloblastomas, que incrementando la concentración del ADN modificado de las muestras de análisis, aumenta el número de casos obtenidos con resultado de metilación, lo que sugiere la posibilidad de que en realidad la metilación en estos tumores sea una metilación parcial, poniéndose de manifiesto sólo si se efectua el análisis en muestras de partida con alta concentración de ADN, por razones puramente técnicas.

Igualmente Ogino et al. (Ogino et al., 2006) demuestran en su serie de 274 casos de cáncer colorrectal en los que analizan cuantitativamente el grado de metilación de *MGMT* mediante RT-PCR (*MethyLight)*, que puede existir metilación por debajo del umbral necesario para inhibir la transcripción y por tanto coexistir con la expresión de la proteína. Según los autores, este tipo metilación carecería de importancia biológica, puesto que no se traduciría obligatoriamente en inactivación del gen.

Del mismo modo, Nagasaka el at. (Nagasaka et al., 2008) demuestran en una serie de 233 carcinomas colorrectales que es necesaria la metilación extensa del *core* del promotor de *MGMT* para que se produzca reducción o pérdida de la expresión de MGMT, y que por tanto, las metilaciones parciales no conllevan necesariamente el silenciamiento del gen.

En el caso concreto de los tumores cerebrales, Möllemann et al. (Möllemann et al., 2005), y Shaw et al. (Shaw et al., 2008) entre otros autores, estudian mediante secuenciación el porcentaje de metilación de las islas CpG del promotor de una serie de tumores oligodendrogliales, demostrando que el patrón de metilación es variable de unos casos a otros, tanto desde un punto de vista cuantitativo (porcentaje de islas metiladas) como cualitativo (mayor frecuencia de metilación de determinadas islas respecto de otras); además, demuestran que por debajo de un 50% de metilación no se produce silenciamiento del gen.

En este contexto, algunos autores contemplan incluso como escenario la posibilidad de que el proceso de silenciamiento de un gen mediante metilación sea un proceso de desarrollo gradual, produciéndose de manera progresiva, y siendo la metilación del promotor un evento tardío en todo el proceso (Bozboga et al., 1996). De este modo, la MSP realizada sobre una muestra de tejido correspondiente a una parte del tumor podría detectar metilación, mientras que en otras áreas del tumor podría existir expresión de proteína (Maxwell et al., 2006).

6.1.2. OTROS MECANISMOS REGULADORES DE LA EXPRESIÓN / ACTIVIDAD DE MGMT

Además de la hipermetilación de islas CpG del promotor, en los últimos años se han descrito otros posibles mecanismos reguladores de la expresión de MGMT, a saber:

- *TP*53: parece influir en la expresión de MGMT independientemente del estado de metilación del promotor (Rodriguez et al., 2008). La sobrexpresión de p53 en cultivos celulares parece inhibir la transcripción de *MGMT* (Harris et al., 1996; Srivenugopal et al., 2001). El mecanismo mediante el cual se produce esta inhibición podría ser la unión directa de p53 al promotor de *MGMT* (Blough et al., 2007; Hermisson et al., 2006; Osanai et al., 2005).

Localizado en *17p13*, el gen *TP*53 codifica la proteína p53, que es un factor de transcripción multifuncional, implicado en el control del ciclo celular, en el mantenimiento de la integridad del ADN, y en la supervivencia de las células expuestas a agentes genotóxicos, como la radioterapia y la quimioterapia, o no genotóxicos, como la hipoxia. En condiciones normales, cualquier insulto sobre el ADN, induce una activación de *TP*53 y la acumulación transitoria de la proteina en el núcleo celular. Esto da lugar a la activación transcripcional de los genes diana de p53 que son, precisamente, aquellos responsables de detener el ciclo celular o incluso de inducir la apoptósis de la célula (Ohgaki et al., 2007).

No obstante, es importante recordar que tal como se expuso en la Introducción de la presente tesis la mutación de *TP*53 es una de las características genéticas más frecuentes y más precoces de los gliomas de estirpe astrocitaria por lo que quizás, *in vivo* este mecanismo de regulación de MGMT no resulte muy relevante. Sin embargo, algunos autores han apuntado ya que existe suficiente evidencia para plantear terapia génica con transferencia del gen *TP*53 en combinación con los agentes alquilantes de uso rutinario. De este modo se produciría en los tumores una depleción funcional de MGMT, mejorando la quimiosensibilidad de los mismos (Srivenugopal et al., 2001).

- LOH10: delección presente en la mayoría de los glioblastomas (entre el 60 y el 95%) y en un alto porcentaje de los gliomas anaplásicos (entre el 30 y el 70%) (Collins y James, 1993; Karlbom et al., 1993; Leenstra et al., 1998; Louis et al., 2007; Maier et al., 1997; Yoshimoto et al., 2002). La región que con mayor frecuencia parece deleccionarse es la 10*q24* a 10*q26* (Kimmelman et al., 1996).

El gen *MGMT* abarca alrededor de 300kb en el brazo largo del cromosoma 10 (10*q26*). Esta ubicación implica que en aquellos tumores en los que existe pérdida de heterocigosidad de *10q* (LOH*10q*), podría existir una "haploinsuficiencia" para *MGMT*, lo que supondría cambios en la expresión y actividad de la proteína, incluso en ausencia de metilación del promotor del alelo restante (Iafrate y Louis, 2008; Margison et al., 2003; Pegg, 2000; Rolhion et al., 1999).

Es además importante tener en cuenta que esta delección implica pérdida de múltiples loci y por ello de otros genes supresores o reguladores que eventualmente podrían influir de manera decisiva en el comportamiento biológico del tumor (Inoue et al., 2003; Maxwell et al., 2006; Tada et al., 2001) independientemente de MGMT. Desafortunadamente, la asociación entre la delección cromosómica y la expresión de la proteína no está perfectamente definida (Halford et al., 2005).

- "Sitios de unión para AP-1" y "Elementos sensibles a corticoides" del promotor: la región del promotor de *MGMT* contiene 2 posibles sitios de unión para AP-1 *(Activator Protein-1 binding sites)* y 2 posibles elementos sensibles a corticoides ("G*lucocorticoid Response Elements")* (Augustine et al., 2009; Boldogh et al., 1998; Pegg, 2000). El AP-1 es un factor de transcripción que regula la expresión genética en respuesta a determinados estímulos como el estrés, determinadas citokinas, factores de crecimiento o infecciones. La existencia de elementos sensibles a corticoides implica que en presencia de glucocortocoides podría producirse un incremento en la expresión de MGMT y por tanto de la resistencia tumoral a los agentes alquilantes.

Estudios en líneas celulares han demostrado que la exposición de células HeLa S3, U138MG, T98G, A172 y U87MG a dexametasona incrementa hasta en 2.5 veces los niveles de ARNm de MGMT, y hasta en 2 veces los niveles de proteína MGMT (Biswas et al., 1999; Grombacher et al., 1996; Ueda et al., 2004). Por ello algunos autores sostienen que, al menos desde un punto de vista teórico, el tratamiento con dexametasona podría resultar perjudicial en los pacientes con gliomas ya que conllevaría teóricamente un aumento de la expresión de MGMT y por lo tanto un incremento de la resistencia a los agentes alquilantes (Issa, 2003; Parkinson et al., 2008; Reardon et al., 2006). Este hecho no ha sido demostrado en la clínica hasta la fecha y son necesarios más estudios para emitir conclusiones sólidas al respecto.

- Exposición a agentes genotóxicos: la exposión a agentes genotóxicos como son los propios agentes alquilantes, o la radioterapia, pueden *per se* inducir la expresión de MGMT por las células tumorales, tal y como ha sido demostrado en estudios *in vivo* sobre modelos animales

y en estudios *in vitro* sobre líneas celulares (Fritz et al., 1991). De mismo modo en humanos, Capper et. al describen cambios en la expresión de MGMT en 19 glioblastomas de pacientes sometidos a segundas intervenciones quirúrgicas por recidiva o progresión, tras haber recibido tratamiento complementario (Capper et al., 2008).

Aunque las diferencias en el perfil de expresión de MGMT halladas por estos autores no alcanzaron la significación estadística, y otros grupos no han podido demostrar estos hallazgos en sus respectivas series (Hermisson et al., 2006), parece que la lesión del ADN provocada por los agentes alquilantes podría desencadenar un aumento de la actividad antiapoptótica celular implicada en el fenómeno de quimiorresistencia tumoral, siendo el incremento en la expresión y actividad de MGMT parte de éste.

El mecanismo exacto por el que los agentes genotóxicos inducen estos cambios en la expresión de MGMT continua siendo hoy día enigmático, aunque se ha apuntado al factor nuclear kB (NF-kB) como probable responsable del mismo.

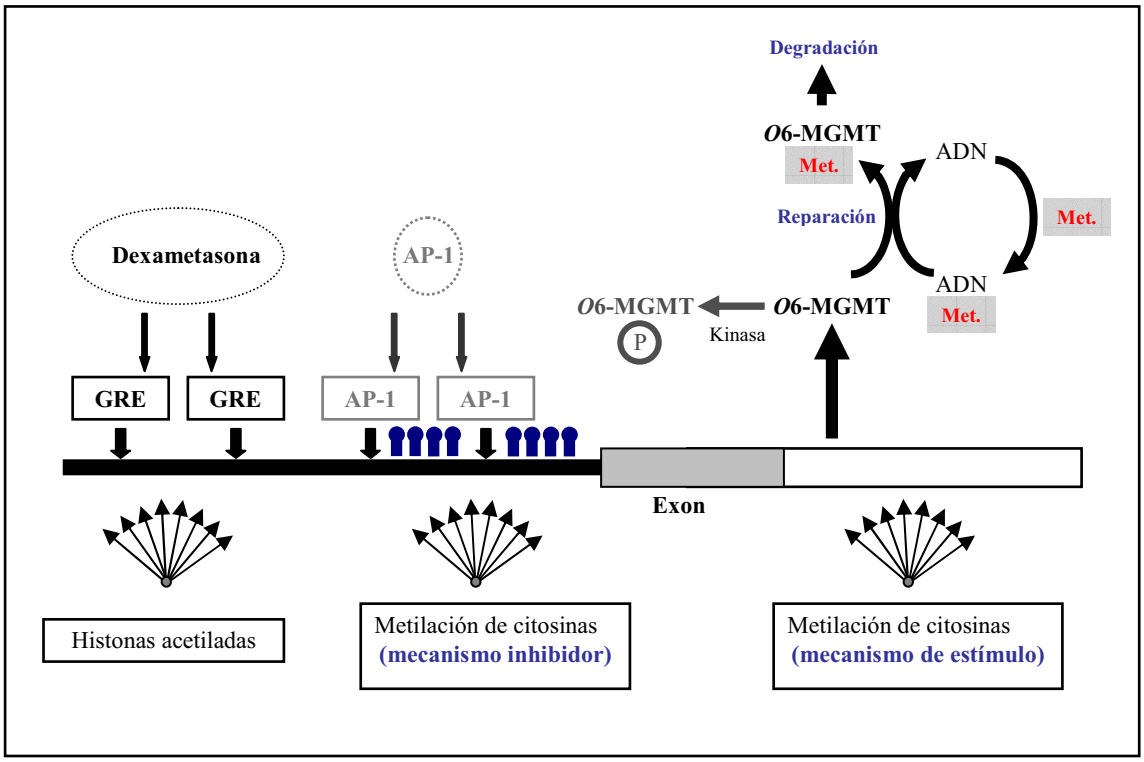
NF-kB pertenece a una familia de factores de transcripción diméricos, que estimulan la expresión de algunos genes. Estudios realizados en líneas celulares y en células tumorales han demostrado que NF-kB puede inducir la expresión de ARNm y de proteína MGMT independientemente del estado de metilación del promotor (Lavon et al., 2007; Metellus et al., 2009).

- Fenómenos post-transcripcionales: determinados fenómenos post-transcripcionales como la fosforilación pueden disminuir la expresión de MGMT o inactivarla. Existe evidencia demostrada *in vitro* sobre la capacidad de MGMT para sufir una fosforilación reversible en respuesta a determinadas señales. Esta fosforilación sirve a la célula como mecanismo para modificar la actividad reparadora del ADN de MGMT (Srivenugopal et al., 2000).

Las circunstancias y el grado en que MGMT es regulada mediante este proceso de fosforilación es incierto, ya que además de regular la función de la proteína, los procesos de fosforilación parecen estar también implicados el otros aspectos biológicos de MGMT como son su localización nuclear, su degradación, su transporte intracelular etc. (Srivenugopal et al., 1996).

En la Figura I.6. se resumen los diversos mecanismos que se barajan como potencialmente reguladores de la trancripción y por tanto de la expresión de MGMT:

Figura I.6.: Mecanismos reguladores de la expresión de MGMT



6.1.3. HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL

Que los gliomas son tumores heterogéneos es un hecho bien conocido. Tanto desde el punto de vista histológico, como desde el punto de vista radiológico o microquirúrgico, resulta evidente que en el seno de un glioma pueden coexistir áreas con mayor o menor diferenciación, de distinto grado e incluso de diferente estirpe histológica.

Como ya se expuso en la Introducción, esta heterogeneidad debe ser tenida en cuenta en la práctica clínica diaria, sobre todo en aquellos casos de diagnóstico mediante biopsia estereotáxica debido a que los pequeños fragmentos obtenidos pueden no ser representativos de la totalidad del tumor, tal y como demuestran Jackson et al. (Jackson et al., 2001) y McGirt et al. (McGirt et al., 2003), entre otros autores.

La heterogeneidad de los gliomas, ha sido señalada como otra posible razón para explicar la ausencia de correlación entre metilación del promotor y expresión de la proteína de

MGMT. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con la heterogeneidad histológica o radiológica, la existencia de heterogeneidad genética en los gliomas no es universalmente aceptada. Si las características moleculares de los gliomas son o no idénticas en todas las células que componen el tumor es motivo de investigación en la actualidad, existiendo cierta controversia al respecto.

En relación a la expresión de MGMT, se acepta en general, y así lo demostramos en nuestra serie, que ésta es heterogénea en los gliomas, existiendo una gran variabilidad entre tumores de la misma estirpe e incluso entre áreas distintas de un mismo tumor (Liu y Gerson, 2006; Reardon et al., 2006; Yip et al., 2008). Es por lo tanto habitual cuando se estudia la expresión de la proteína mediante IHQ, observar áreas tumorales con ausencia completa de expresión de MGMT alternando con otras áreas que se muestran como altamente positivas (Lee et al., 1996).

Aunque la contaminación de la muestra por células no neoplásicas (y por lo tanto inmunopositivas para MGMT) que asientan en el seno del tumor, ha sido señalada por algunos autores como causa de estos hallazgos y por lo tanto como posible motivo de falsos positivos, la existencia de subpoblaciones celulares dentro del mismo tumor con diferente grado de expresión de MGMT es la tesis defendida también por otros grupos (Hayashi et al., 2002; Jullierat-Jeanneret et al., 2008; Kim et al., 2003; Liu y Gerson, 2006; Preusser et al., 2008; Sasai et al., 2008; Zhang et al., 2008). En este sentido, Capper et al. (Capper et al., 2008) demuestran en una serie de 75 glioblastomas, la presencia de inmunoexpresión de MGMT significativamente mayor en la periferia tumoral respecto del centro. En nuestra serie de gliomas anaplásicos también hallamos diferencias claras entre regiones distintas de algunos tumores.

En lo referente al estado de metilación del promotor el problema alcanza aun mayor grado de complejidad.

Algunos autores defienden que el estado de metilación del promotor de *MGMT* en los gliomas es homogéneo en todas las células que componen el tumor. Así, Grasbon-Frodl et al. (Grasbon-Frodl et al., 2007) analizan una serie de biopsias estereotácticas seriadas procedentes de 25 gliomas malignos, observando un perfil de metilación homogéneo. Igualmente Cao et al. (Cao et al., 2009) demuestran homogeneidad en el estado de metilación del promotor de *MGMT* en 37 muestras correspondientes a áreas distintas de 12 glioblastomas, y Parkinson et al. (Parkinson et al., 2008) reproducen estos resultados en 7 glioblastomas en los que encuentran homogeneidad en la metilación del promotor, en el porcentaje de islas CpG metiladas por secuenciación, y en la expresión de proteína en 5 de los 7 casos.

No obstante, un dato incontestable apreciado tanto en nuestra serie como en muchas otras de la literatura, es que prácticamente todos los tumores que muestran metilación del promotor por MSP, presentan también amplificación de la banda de no-metilación (Brell et al., 2005; Cankovic et al., 2007; Yachi et al., 2008). De nuevo, la presencia de ADN no tumoral procedente células no neoplásicas que contaminan el tumor puede ser una explicación plausible para este hallazgo (Esteller et al., 1999), e incluso algunos autores, ante la presencia de una doble amplificación (metilación y no-metilación) en la misma muestra, interpretan que se trate probablemente de tumores parcialmente metilados. Sin embargo, la existencia de heterogeneidad inter e intratumoral debe ser también considerada.

Dicho de otro modo, la observación simultánea de metilación y no-metilación en algunos tumores, puede traducir la coexistencia de algunas células tumorales con promotor no-metilado que se entremezclan con otras que poseen hipermetilación del promotor (Esteller et al., 1999; Herfarth et al., 1999; Smith-Sorensen et al., 2002; Yip et al., 2008) e incluso la existencia de un alelo metilado y otro no metilado dentro de la misma célula (Blanc et al., 2004; Crinière et al., 2007; Dunn et al., 2009). Así, tal como demuestra Choy et al. (Choy et al., 2002) en una serie de 23 retinoblastomas, el hallazgo de promotor metilado por MSP en un tumor, no resulta incompatible con la coexistencia de expresión de ARNm y proteína determinados mediante IHQ y Western Blot en el mismo tumor.

Las subpoblaciones celulares con diferente estado de metilación del promotor de *MGMT* han sido denominadas “mosaicos de metilación”. La hipótesis que sostiene por tanto la existencia de heterogeneidad, es decir de “mosaicos de metilación” en algunos tumores, ha sido demostrada por Yachi et al. (Yachi et al., 2008) en su estudio sobre 7 líneas celulares hallando en dos de ellas (T98G y U-251MG) metilación y no-metilación del promotor simultaneamente. Rastetter et al. (Rastetter et al., 2007) lo demuestran en melanomas. Del mismo modo, Dunn et al. (Dunn et al., 2009), Jullierat-Jeanneret et al. (Jullierat-Jeanneret et al., 2008) y Parkinson et al. (Parkinson et al., 2008) describen en sus respectivas series de gliomas, variaciones en el grado de metilación del promotor de *MGMT* entre zonas del tumor sin diferencias morfológicas obvias.

La heterogeneidad genética intratumoral entre áreas histológicamente diferentes de un glioma, o entre zonas morfológicamente idénticas del mismo tumor (Walker et al., 2003), no es exlusiva de *MGMT* habiéndose descrito también heterogeneidad en las mutaciones de *TP*53, o en la expresión de VEGF, integrina αvβ5, vitronectina o tensacina (Bello et al., 2001; Ren et al., 2007).

Se desconoce en la actualidad si esta heterogenidad es epigenética o clonal así como el significado o la importancia biológica de la misma (Parkinson et al., 2008) y se ha clasificado en región-independiente o región-dependiente.

Se entiende por heterogeneidad región-independiente, aquella que no sigue un patrón de distribución regular en el tumor, y parece originarse durante el desarrollo o génesis tumoral. Dentro de este subtipo se encuadraría la heterogeneidad observada para MGMT de modo que, durante la carcinogénesis, un clon de células tumorales con promotor metilado de una pequeña región se expandiría hasta dominar todo el tejido tumoral (Bae et al., 2002). Por el contrario, la heterogeneidad región-dependiente es aquella que define regiones específicas en el tumor (por ejemplo, centro *vs* periferia) y se ha atribuido al crecimiento y a la progresión tumoral, por lo que quizás esté más relacionada con el microambiente celular (Hoelzinger et al., 2005). En este tipo se incluiría por ejemplo la heterogeneidad de factores relacionados con la invasividad tumoral (Bellail et al., 2004; Guo et al., 2005).

6.1.4. ASPECTOS METODOLÓGICOS

Uno de los principales problemas que se plantean a la hora de comparar los resultados obtenidos de diferentes estudios clínicos, es la heterogeneidad en las técnicas de laboratorio empleadas para estudiar MGMT. Mientras que en algunas series se ha analizado la metilación del promotor del gen, otras evaluan la expresión de mRNA mediante RT-PCR, de proteína mediante IHQ, Western Blot, etc., o incluso de actividad de la misma mediante enzimografía.

Ninguno de los test empleados para el estudio de MGMT ha sido, hasta la fecha, estandarizado ni validado para uso clínico rutinario en la práctica diaria. Ello podría en parte explicar las diferencias en los resultados publicados y la falta de correlación entre los datos de metilación y los de expresión de la proteina (Metellus et al., 2009; Nagane et al., 2007).

Por todo ello, la técnica idónea para el análisis de este marcador molecular es todavía motivo de discusión en la literatura (Chinot et al., 2007; Idbaih et al., 2007; Karayan-Tapon et al., 2009; Shaw et al., 2008; Yip et al., 2008) no existiendo a día de hoy un método que siendo fiable, rápido, eficaz y rentable sea universalmente aceptado como patrón oro para su uso en la práctica clínica (Spiegl-Kreinecker et al., 2010; Weller et al., 2010; Wojdacz y Dobrovic, 2007).

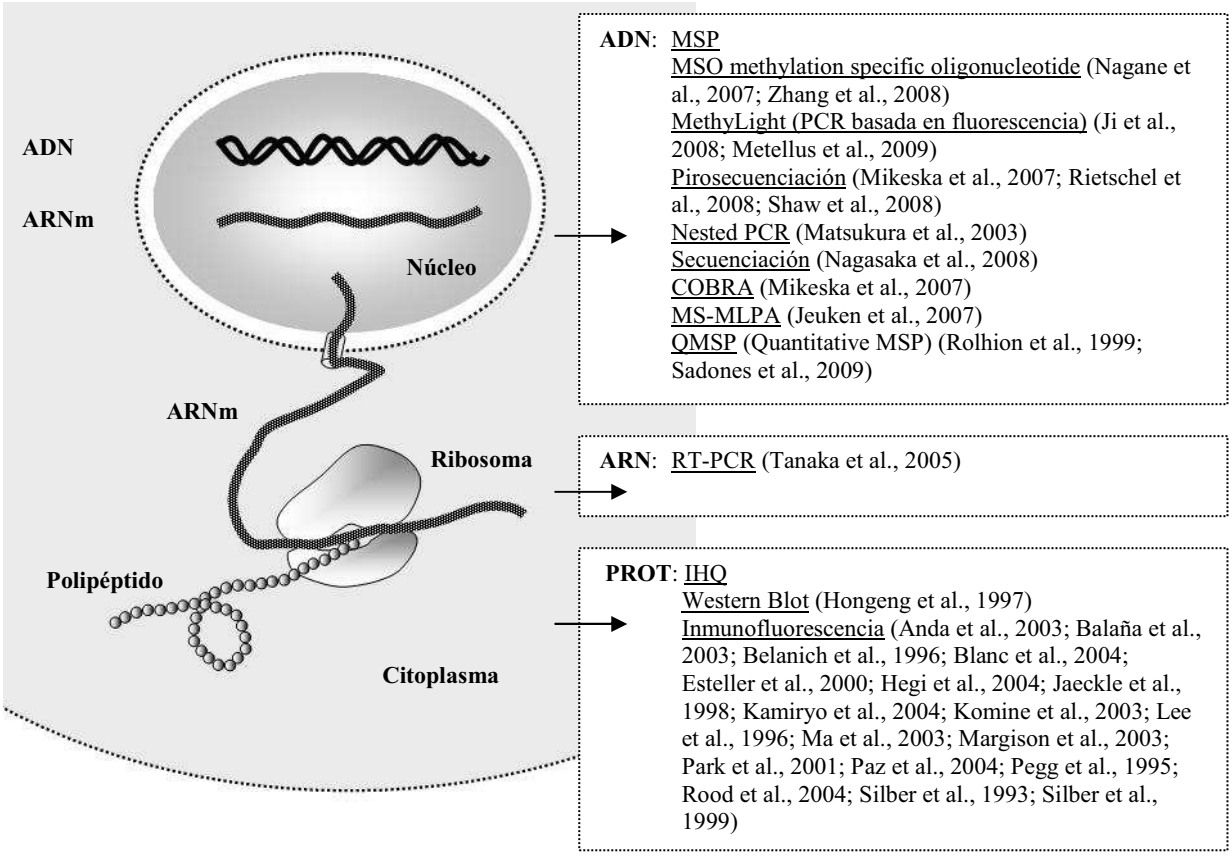
De hecho, la proporción de tumores con metilación del promotor, con mayor o menor expresión de ARNm o proteína, o con mayor o menor actividad de la misma, varía de manera

sustantiva en las distintas series de la literatura, inclusive entre aquellas que incluyen tumores de idéntica estirpe y grado de malignidad (Parkinson et al., 2008).

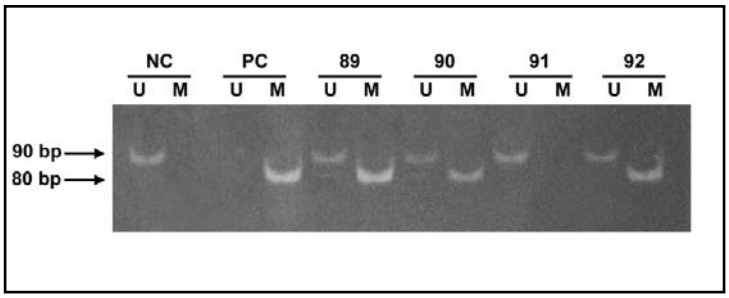
En la última década han sido numerosas las técnicas de laboratorio empleadas para el estudio de MGMT: desde aquellas que permiten analizar ADN como la MSP y modificaciones de la misma, MSO (*"methylation specific oligonucleotide"* (Zhang et al., 2008)), QMSP ("*quialitative MSP")* (Sadones et al., 2009), pirosecuenciación (Mikeska et al., 2007; Shaw et al., 2008), COBRA (Mikeska et al., 2007), MS-MLPA (Jeuken et al., 2007) etc., a las que evaluan expresión de ARMm como la RT-PCR (Tanaka et al., 2005), o de proteina como la IHQ, el Western Blot (Hongeng et al., 1997), o la inmunofluorescencia (Figura I.7.).

De todas ellas, han sido fundamentalmente la MSP y la IHQ las más empleadas y por ello nos centraremos en éstas.

Figura I.7.: Técnicas de laboratorio más comunes empleadas para el estudio de MGMT



- PCR SPECÍFICA DE METILACIÓN (MSP):



Considerada hoy en día el test de referencia y el estándar de oro para la valoración de MGMT, es el único que ha mostrado de manera repetida en los ensayos clínicos que puede tener un valor pronóstico o predictivo en los gliomas (Hegi et al., 2004; Weller et al., 2010; Wojdacz y Dobrovic, 2007). El fundamento teórico sobre el que se sustenta ha sido ampliamente detallado en el apartado de Introducción de la presente tesis. Brevemente, se basa en la modificación química que se produce en el ADN metilado cuando se somete a tratamiento con bisulfito. A continuación, mediante una PCR estándar y utilizando dos secuencias cebadoras específicas, se obtiene amplificación de la banda de metilación, de la de no-metilación o de ambas.

La determinación del estado de metilación del promotor mediante MSP, resulta técnicamente compleja y con un alto porcentaje de resultados no interpretables incluso fallidos en todas las series publicadas (Jeuken et al., 2007; Vlassenbroeck et al., 2008).

Es una técnica enormemente dependiente de la calidad y cantidad del ADN de la muestra, de la especificidad de los cebadores empleados, de la reacción de modificación con el bisulfito, y de las condiciones de la PCR (Yip et al., 2008). Se trata, en términos generales de una técnica poco reproducible y sujeta a una gran variabilidad intercentro (Hegi et al., 2005), por lo que algunos autores recomiendan repetir el análisis de cada muestra varias veces antes de dar el resultado por válido (Cankovic et al., 2007; Grasbon-Frodl et al., 2007).

En los últimos años, debido a todas estas dificultades algunos grupos de investigación han realizado algunas modificaciones sobre la técnica, e incluso se han desarrollado algunas variantes de la misma en un intento de optimizarla (Tabla I.10.). Desafortunadamente, la mayoría de los estudios realizados con estas innovaciones de la técnica original, son igualmente reveladores de dificultades, al tiempo que complican aun más la interpretación y comparación de los resultados entre los distintos laboratorios (Cankovic et al., 2007). En cualquier caso se trata de técnicas mucho menos empleadas y por lo que nos centraremos básicamente en la MSP convencional en la presente discusión.

Tabla I.10.: Técnicas de laboratorio basadas en el análisis específico de metilación del ADN empleadas para el estudio de MGMT (modificado de Weller et al. (Weller et al., 2010))**.**

Técnica	Propiedades	Principio	Lectura	Ventajas	Inconvenientes
Metilación específica de clones y posterior secuenciación (*"MS clone sequencing")*	Cuantitativa	Secuencias modificadas y amplificadas son clonadas a un vector y amplificadas por una bacteria. Posteriormente cada clon es secuenciado	Estado de metilación en todas las islas CpG para cada alelo individual	Exhaustivo	Escaso rendimiento
MSP convencional *("MSP gel-based")*	Cualitativa	Amplificación de secuencias metiladas y no metiladas	Presencia o ausencia de metilación	Alta sensibilidad	Difícil estandarización
MSP-Cuantitativa *("qMSP")*	Cuantitativa	MSP en tiempo real	Promotor completamente metilado en relación a ß-actina	Estandarizado, alto rendimiento	Excesivamente restrictivo al reconocer sólo promotor completamente metilado.
MethyLight qMSP	Cuantitativa	MSP en tiempo real con sonda específica par metilación	Promotor completamente metilado en relación gen control	Estandarizado, alto rendimiento	Excesivamente restrictivo al reconocer sólo promotor completamente metilado.
Pirosecuenciación	Semicuantitativa	Cuantificación de nucleótidos durante la secuenciación	Porcentaje de metilación del total de islas CpG analizadas	Estandarizado, alto rendimiento. Control interno de la conversión con bisulfito	Definición del punto de corte
COBRA	Semicuantitativa	Cuantificación de secuencias metiladas	Porcentaje de secuencias metiladas	Alta esfecificidad. Control interno de la conversión con bisulfito	Laborioso. Definición del punto de corte
MS-MPLA *("Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification")*	Semicuantitativa	Amplificación de secuencias metiladas	Media (relación entre alelos metilados frente a no metilados)	No es necesaria la conversión con bisulfito. Alto rendimiento	Definición del punto de corte
MS-HRM *("MS-High-Resolution Meeting")*	Semicuantitativa	PCR cuantitativa	Porcentaje de secuencias metiladas definidas por una curva estandar	Analiza regiones amplias. Estandarizada Alto rendimiento	Definición del punto de corte

En relación a la MSP convencional, algunos autores sostienenen que adolece de demasiados problemas para su implementación rutinaria en la práctica clínica diaria (Sadones et al., 2009). A continuación se exponen las principales limitaciones señaladas por estos autores:

En primer lugar no se obtendrán resultados concluyentes de aproximadamente un tercio de los bloques de parafina, por material insuficiente, presencia de necrosis tumoral extensa o por haber sido fijados bajo determinadas condiciones adversas para la posterior calidad del ADN, lo cual es una limitación fundamental para su aplicación en aquellos centros en los que se carece de medios para almacenar muestras de tejido congelado. Además, los resultados obtenidos pueden variar de manera significativa en función de que se analicen muestras de tejido parafinado o de tejido congelado, resultando la proporción obtenida de tumores metilados menor si el análisis se efectúa sobre muestras de parafina que si se realiza sobre muestras congeladas (Jullierat-Jeanneret et al., 2008). Aunque los motivos por los cuales sucede ésto se desconocen, se especula que pueda deberse a una mayor calidad del ADN en las muestras congeladas (Everhard et al., 2006).

Y si la rentabilidad de la MSP sobre muestras parafinadas es baja, aún lo es más en aquellos casos en los que, por tratarse de biopsia y no de resecciones, la cantidad de muestra es pequeña (Preusser et al., 2008). Ello conlleva que en las series en las que se ha empleado esta técnica, exista escasa o nula representación de pacientes biopsiados, lo que puede influir de manera decisiva en el análisis estadístico de supervivencia (Brandes et al., 2009; Gorlia et al., 2008). Así, en el estudio de Hegi et al. sólo se dispuso de material suficiente para realizar el test en la mitad de los casos (esto es, en 307 pacientes), y sólo en 206 (67%) de ellos se obtuvo un resultado concluyente (Hegi et al., 2005). Ello supone un 37% de resultados válidos sobre el total de casos analizados, siendo este porcentaje incluso inferior en otras series publicadas (Rodriguez et al., 2008).

En segundo lugar, el hecho de que para el análisis de metilación se empleen homogenados del tejido tumoral, hace que la variabilidad de densidad celular o la contaminación en la muestra por células no neoplásicas puedan influir de manera importante en los resultados (Chinot et al., 2007; Sasai et al., 2008; Yachi et al., 2008).

En tercer lugar, el tratamiento con bisulfito puede degradar *per se* el ADN problema (Hegi et al., 2008), de hecho está demostrado que tras 4 horas de tratamiento con bisulfito a 55ºC, entre el 84 y el 96% del ADN habrá sufrido una degradación severa dando lugar a posibles falsos negativos (Ogino et al., 2006). Del mismo modo, si tras el tratamiento del ADN con bisulfito se produce una conversión incompleta, o si se efectúa un número excesivo de ciclos en la PCR se originarán amplificaciones inespecíficas (Lenz et al., 2004; Shaw et al.,

2008; Wojdacz y Dobrovic, 2007; Yachi et al., 2008) obteniéndose también falsos negativos y falsos positivos respectivamente.

En cuarto lugar, aunque algunos autores afirman que la presencia de metilación en una muestra es expresión inequívoca de metilación del promotor en las células neoplásicas (Esteller et al., 2000; Hegi et al., 2004; Stupp et al., 2007), Silber et al. (Silber et al., 1993) demuestran en su serie de tumores cerebrales de diversa estirpe, una ausencia de actividad de MGMT en el parénquima cerebral sano adyacente al tumor en aproximadamente la mitad de los casos estudiados. Podría asumirse por lo tanto, según estos autores, que las mismas alteraciones epigenéticas responsables del silenciamiento del gen en las células neoplásicas, pueden afectar al parénquima cerebral infiltrado por la neoplasia, siendo otra causa de posibles falsos positivos en el análisis de metilación (Bobola et al., 1995).

Del mismo modo Zhang et al. (Zhang et al., 2003) demuestran la presencia de promotor hipermetilado en el tejido sano adyacente a carcinomas escamosos de esófago, inclusive en 2 casos en los que no se detectó metilación del promotor en la muestra tumoral. Por todo esto, se acepta en la actualidad que la hipermetilación del promotor de *MGMT* puede suceder también en tejido sano peritumoral y en lesiones premalignas (Brock et al., 2003; Kuester et al., 2009; Liu y Gerson, 2006).

En quinto lugar, otra de las limitaciones de la MSP más señalada por diversos expertos, es un exceso de sensibilidad inherente a la técnica, que ocasiona que bajo determinadas condiciones pueda obtenerse un resultado de metilación aunque el porcentaje de células metiladas sea una clara minoría en la muestra analizada, y por ello puede sobreestimar el porcentaje de tumores cuya metilación es biológicamente relevante (Bae et al., 2002; Halford et al., 2005; Nagarajan y Costello, 2009).

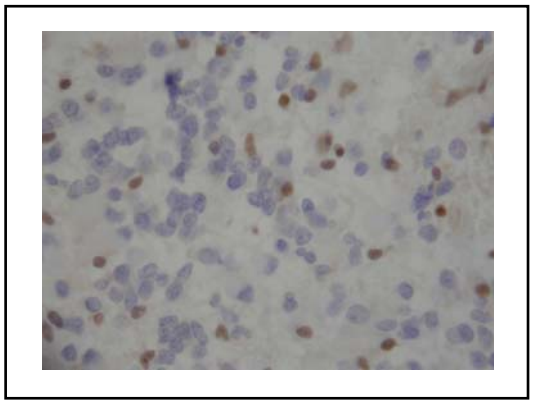
Sin embargo, es importante recordar que, aunque detecta con alta sensibilidad metilación en las islas CpG del promotor, no detecta metilación en otros lugares del gen que pueden también influir en la transcripción del mismo y por ende en la expresión final de la proteína (Lavon et al., 2007).

Por último decir que la MSP hace una valoración cualitativa de las muestras, dicotomizando los resultados en metilados y no-metilados. No es por lo tanto posible mediante MSP diferenciar aquellos tumores que aunque metilados presentan unos niveles de metilación por debajo del umbral de silenciamiento transcripcional, y en los que por tanto la metilación *per se* podría no ser biológicamente importante (Kitange et al., 2008; Ogino et al., 2006). Así, aquellos tumores con un patrón “en mosaico de metilación”, por ejemplo, podrían dar lugar a falsos positivos y falsos negativos (Mikeska et al., 2007).

La disponilidad en la actualidad de algunas técnicas nuevas basadas en la MSP original, pero que permiten hacer una valoración cuantitativa o semicuantitativa del estado de metilación, ha confirmado que es necesario un nivel mínimo de metilación para que disminuya de manera significativa la expresión de ARNm y por tanto de proteina (Shaw et al., 2008), es decir, que existe un subgrupo de pacientes en los que puede existir un grado intermedio de metilación representando "una zona gris" en los resultados (Weller et al., 2010). Estas técnicas requieren, no obstante ser validadas y estandarizadas tal como se ha expuesto previamente (Cankovic et al., 2007; Möllemann et al., 2005; Ogino et al., 2006; Ohe et al., 2003).

Además, por tratarse de una técnica de valoración cualitativa está sujeta a cierta subjetividad en la interpretación de los resultados, ya que no es infrecuente observar bandas muy tenues en el gel de electroforesis de significado incierto (Lee et al., 2008).

- INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ):



Dado que la consecuencia fundamental de la hipermetilación del promotor de *MGMT* es el silenciamiento del gen por inhibición de la transcripción del mismo, parecería lógico pensar que el análisis de la expresión de la proteína mediante IHQ puede resultar equivalente a la determinación del estado de metilación del promotor.

El hecho de que la IHQ sea una técnica más económica y sencilla que la MSP, universalmente extendida y ampliamente utilizada en los laboratorios de anatomía patológica, ha inclinado a numerosos grupos entre los cuales nos incluimos a seleccionarla para el análisis de MGMT (Karayan-Tapon et al., 2009). Desafortunadamente, la IHQ adolece al igual que la MSP de ciertos problemas para su uso rutinario, que a continuación expondremos:

En primer lugar, y tal como se ha expuesto ya en varias ocasiones, en el seno de los gliomas existen células no neoplásicas (glia, células endoteliales, linfocitos etc.) que pueden expresar MGMT (Jeuken et al., 2007; Yuan et al., 2003). La inmunorreactividad positiva de estas células puede confundir al observador y dificultar la interpretación de los resultados.

Sin embargo, este hecho que a priori se considera una limitación, y ha sido señalado por los detractores de la técnica como principal causa de la ausencia de correlación entre estado de metilación del promotor y la expresión de la proteína, puede servir al mismo tiempo de control interno de la misma (Hegi et al., 2008; Rodriguez et al., 2008).

Además, a diferencia de la MSP que se realiza sobre un homogeneizado de tejido neoplásico, la IHQ permite mediante visualización directa al microscopio, analizar la expresión de proteína en cada célula individual y valorar por lo tanto, si la expresión protéica es o no tumoral (Maxwell et al., 2006; Sasai et al., 2008). Así lo demuestran Nakasu et al. (Nakasu et al., 2004) en su estudio sobre expresión de MGMT en una serie de tumores cerebrales malignos y en tejido cerebral no neoplásico obtenido de especímenes de autopsia y de piezas quirúrgicas de pacientes sometidos a exéresis de contusiones o abscesos cerebrales. En dicho estudio, los autores observan inmunoexpresión de MGMT en las células ependimarias y endoteliales de los cerebros de autopsia. Además, observan la presencia de células inmunoreactivas correspondientes a astrocitos y oligodendrocitos en la sustancia blanca, siendo las neuronas consistentemente negativas. En las contusiones cerebrales y en los abscesos, además de expresión de MGMT en las células endoteliales, hallaron también positividad en los astrocitos reactivos presentes, en algunos linfocitos y en algunas células de microglía. En cuanto a los tumores cerebrales, describen la presencia de linfocitos inmunopositivos localizados alrededor de los vasos y entre las células tumorales, e igualmente las células endoteliales resultaron también positivas.

Ante estos hallazos, los autores cuantificaron el porcentaje de células no neoplásicas que expresaban MGMT y asentaban en el seno de los tumores, comprobando que dicho porcentaje no excedía en ningún caso el 7% de la celularidad total de la muestra.

Parece por lo tanto, que la posibilidad de que la infiltración tumoral por células no neoplásicas inmunopositivas confunda la interpretación de los resultados siendo causa de falsos positivos en el análisis inmunohistoquímico, disminuye de manera importante si se selecciona un umbral de positividad adecuado (superior al 7% de células positivas).

No obstante, dado que los linfocitos, los macrófagos/microglía que infiltran el tumor, y las células endoteliales de los capilares normales y proliferativos en el seno del mismo pueden expresar de manera inconsistente MGMT, algunos autores recomiendan realizar simultáneamente detección inmunohistoquímica de otros marcadores específicos: CD3, CD20,CD68 y factor VIII (Sasai et al., 2008).

En segundo lugar, otro motivo de controversia es precisamente el punto de corte seleccionado para considerar un tumor como inmunopositivo (Brell et al., 2005; Friedman et al.,

1998; Ohe et al., 2003; Preusser et al., 2008). Mientras que algunos grupos establecen un solo punto de corte aleatorio que oscila entre el 5 y el 20% de células positivas (Friedman et al., 1998; Nakasu et al., 2004) o la mediana (Chinot et al., 2007), otros grupos definen tres o cuatro puntos de corte determinando así varios intervalos que distinguen diferentes grados de expresión tumoral (Brell et al., 2005; Möllemann et al., 2005). Por otro lado, Pollack et al. (Pollack et al., 2006) proponen emplear como umbral el 25% por ser esta la cifra aproximada de células immunopositivas que detectan en el parénquima cerebral sano, mientras que Capper et al. (Capper et al., 2008) proponen puntos de corte diferentes en función del grado tumoral (15% de celularidad positiva para los glioblastomas, y 35% en los gliomas de bajo grado). Por último Nakasu et al. (Nakasu et al., 2004) proponen el 10% por ser esta la cifra aproximada de células no neoplásicas e inmunopositivas que se localizan en el seno de los gliomas, tal como se ha expuesto previamente.

Esta gran variabilidad en el punto de corte seleccionado por los diversos grupos, dificulta la comparación de las series y explica en parte la disparidad de resultados obtenidos en las diversas series publicadas con análisis inmunohistoquímico de MGMT. Todo esto será motivo de análisis exhaustivo en el segundo capítulo de este trabajo.

En tercer lugar, la IHQ parece tener una menor sensibilidad en relación a otras técnicas lo que puede llevar a una sobre o infraestimación de la cantidad de proteína realmente presente en el tumor (Maxwell et al., 2006; Ohe et al., 2003). Así, determinados aspectos estrictamente metodológicos relacionados con en el proceso de preservación y fijación de las muestras, o con la antigüedad de las mismas, pueden influir dando lugar a falsos negativos (McCormack et al., 2009).

En el otro extremo, algunos autores han sugerido la posibilidad de que la expresión de MGMT detectada mediante IHQ no refleje realmente la actividad la misma, por poder producirse acúmulo de proteína inactiva en la célula que sería detectada mediante IHQ dando lugar a falsos positivos (Srivenugopal et al., 1996). Del mismo modo, aunque la expresión de MGMT debe ser nuclear para considerar un tumor como positivo (Augustine et al., 2009; Herfarth et al., 1999), por ser la MGMT de localización nuclear la realmente activa, en no pocas ocasiones se observa también la presencia de inmunoreactividad en el citoplasma de algunas células tumorales, siendo hasta la fecha incierto el significado de este hallazgo (Sasai et al., 2008), y otra posible causa de falsos positivos.

En cuarto lugar, otro aspecto debatido es si las células tumorales que no expresan MGMT en el momento del diagnóstico inicial, son realmente incapaces de producir la proteína o por el contrario, podría inducirse en ellas expresión de MGMT exponiéndolas a radiaciones

ionizantes, corticoides o agentes genotóxicos (Jeuken et al., 2007). Si tal como demuestran Capper et. al (Capper et al., 2008) en 19 pacientes con glioblastoma reintervenidos por recidiva o progresión tras el tratamiento complementario, la expresión de MGMT en las células de un glioma es inducible por determinados agentes externos, entonces, la determinación de la expresión en el momento del diagnóstico puede no reflejar la situación real de la misma durante el tratamiento del paciente y por lo tanto podría no ser un factor predictivo ni pronóstico fiable (Biswas et al., 1999; Margison et al., 2003; Preusser et al., 2008; Stupp, 2007). Una vez más, los resultados de la literatura al respecto son contradictorios (Cahill et al., 2007).

Por último del mismo modo que sucede en la MSP, en el análisis mediante IHQ existe también cierta subjetividad en la interpretación de los resultados y consiguientemente cierta variabilidad interobservador, lo que puede también influir en la disparidad de resultados obtenidos entre laboratorios diferentes (Maxwell et al., 2006).

Cualesquiera que sean la verdaderas razones, lo cierto es que existe una relación inconsistente entre el estado de metilación del promotor de *MGMT* y la expresión de MGMT, tanto en los tumores cerebrales como en otro tipo de neoplasias.

Ello indica que la regulación del gen es un fenómeno complejo en el que la presencia de hipermetilación del promotor es sólo uno de los factores influyentes en la expresión final de la proteína (Lavon et al., 2007; Murakami et al., 2004), y ha llevado a algunos expertos a considerar la posibilidad de que la presencia del promotor metilado no sea *per se* la causa directa del comportamiento biológico de los tumores sino que sea en realidad un epifenómeno de alguna otra alteración genética o epigenética más relevante (Iafrate y Louis, 2008).

Parece claro que el análisis de la expresión y/o actividad de MGMT podría no seleccionar el mismo grupo de pacientes que la determinación del estado de metilación del promotor (Nakasu et al., 2004).

Dadas las posibles implicaciones que esto puede conllevar, con repercusión incluso en un futuro cercano, sobre el tratamiento que recibirá el paciente, resulta de vital importancia profundizar en el conocimiento de estos aspectos. Algunos autores han propuesto la asociación de ambas técnicas en la práctica clínica diaria combinando los resultados de las mismas para definir con exactitud el valor pronóstico y/o predictivo de MGMT y así establecer subgrupos de pacientes que se beneficiarán de pautas terapeuticas similares en función del perfil genético de sus tumores (Cao et al., 2009). Otros afirman que la IHQ puede resultar de elección para detectar en un primer cribaje los tumores inmunopositivos y por tanto teóricamente no-metilados, reservando el análisis de metilación en cualquiera de sus variantes para el subgrupo

de tumores que no muestran expresión de la proteína, ya que no siempre estos tumores muestran metilación del promotor (Uccella et al., 2009).

Continua siendo por lo tanto un asunto no resuelto en la actualidad cuál es la técnica óptima para el análisis de MGMT, y para su aplicación en la rutina asistencial de la práctica clínica diaria (Brandsma y van den Bent, 2007; Duffy et al., 2009; Weller et al., 2010). En el capítulo II se lleva a cabo una Revisión Sistemática de la literatura al respecto y un Meta-análisis en un intento de clarificar estos aspectos.

6.2. MGMT COMO FACTOR PRONÓSTICO O FACTOR PREDICTIVO

Los resultados de nuestra serie de gliomas anaplásicos demuestran que la ausencia de expresión inmunohistoquímica de MGMT es un factor pronóstico independiente de supervivencia global en el subgrupo de pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico, por encima de otros factores pronósticos clínico-patológicos clásicos conocidos. Por el contrario, la presencia de hipermetilación del promotor de *MGMT* no mostró influencia pronóstica, si bien el número de casos de los que se obtuvo resultado concerniente al estado de metilación de *MGMT* fue bajo.

Ante estos hallazgos se suscita la pregunta: ¿es MGMT un verdadero factor pronóstico o, dado que parece ejercer influencia exclusivamente sobre el subgrupo de pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico, se trata en realidad de un factor predictivo?.

El valor pronóstico y/o predictivo de MGMT en los gliomas ha sido durante los últimos años, y continua siendo en la actualidad, motivo de investigación (Weller et al., 2010). Tanto el significado clínico de la expresión proteica o de ARNm, como el del estado de metilación del promotor han sido evaluados por numerosos grupos y los resultados obtenidos han sido contradictorios.

Conviene recordar, tal como se expuso en la Introducción que entendemos por factor pronóstico aquel presente en el momento del tratamiento quirúrgico del paciente, y que se relaciona con su supervivencia global o libre de progresión/recidiva independientemente de si éste recibe o no radio y quimioterapia posteriormente. Por lo tanto, los factores pronósticos en una determinada enfermedad proporcionan información en relación al curso natural de la misma.

Por el contrario, factor predictivo es aquel que se asocia a la respuesta a una determinada terapia y por ello, sólo influye en la supervivencia del paciente si éste recibe dicho tratamiento (Riemenschneider y Reifenberger, 2009).

La realidad es que en la práctica clínica diaria, resulta difícil en ocasiones distinguir con nitidez si un determinado factor es pronóstico en sí mismo o si se comporta como factor predictivo de respuesta al tratamiento y secundariamente es causa de un aumento de supervivencia de los pacientes.

6.2.1. VALOR PRONÓSTICO DE MGMT

En lo que respecta al valor pronóstico de MGMT, resulta evidente y así se muestra en las Tablas I.11. y I.12., que la mayoría de la información disponible proviene de estudios realizados en series heterogéneas, en las que se incluyen tumores de histología diversa y diferente grado histológico. Es más, muchas de estas series incluyen incluso protocolos de tratamiento distintos. Además, el análisis de MGMT ha sido realizado utilizando metodología variable lo que dificulta la comparación de los resultados obtenidos por los distintos grupos.

Tabla I.11: Influencia pronóstica de MGMT en tumores cerebrales

Autor / año	n	Histologia	Método	Impacto de metilación del promotor en la supervivencia#		Factor pronóstico independiente en el Análisis Multivariante?
				Supervivencia libre de progresión	Supervivencia global	
Esteller el al., 2000	47	29 GB, 18 AA	MSP	si	si	no
Komine et al., 2003	64	GBG	MSP	si [1]	si [1]	si
Balaña et al., 2003	21	GB	MSP	si	--	--
Paz et al., 2004	92	51 GB, 20 OA, 16 AA, 5 OAA	MSP	no	no[2]	--
Hegi et al., 2004	38	GB	MSP	--	si	si
Kamiryo et al., 2004	116	74 GB, 42 AA	MSP	si [4]	si [4]	si
Blanc et al., 2004	44	GB	MSP	no	no	--
Watanabe et al., 2005	45	29 GB, 16 AA	MSP	si [3]	si [3]	si
Hegi et al., 2005	206	GB	MSP	si	si	si
Brandes et al., 2006	54	AOA, AO	Nested MSP	n.s	n.s	no
Brandes et al., 2006	22	GB	Nested-MSP	no	no	--
Everdard et al., 2006	68	GBG	Nested-PCR	si	--	--
Eoli et al., 2007	86	GB	MSP	si	si	si
Wick et al., 2007	36	GB	MSP	no	no	--
Crinière et al., 2007	219	GB	MSP	n.s	si[5]	si[5]
Ishii et al., 2007	44	20 GB, 16 AA,8O AA	MSP	si	no	no
Brandes et al., 2008	103	GB	MSP	si	si	si
Sadones et al., 2009	38	22 GB, 16 AA y OAA	MSP Cuantitativa	si [4]	si [4]	si [4]
Karayan-Tapon et al., 2009	81	GB	MSP	si	si	no
Fabi et al., 2009	19	10 GB, 8 AA, 1O AA	MSP	no	no	no
Weiler et al., 2009	40	GB	MSP	si	no	--

Van den Bent et al., 2009	152	OA	MS-MLPA[5]	si	si	si
Kesari et al., 2009	20	GBG	MSP	no	si	--
Prados et al., 2009	44	GB, Gliosarcoma	MSP	--	si	--
Vogelbaum et al., 2009	25	AO, OAA	MSP	no	no	--
Kuo et al., 2009	49	GBG, GA	MSP	no	no	si [6]
Piperi et al., 2009	23	GBG, GB	MSP	--	si [7]	--
Metellus et al., 2009	22	GB	MSP	si	si	si
Weller et al., 2009	301	GB	MSP	si	si	si
Sonoda et al., 2009	39	GB	MSP	si	si	si
Wick et al., 2009	318	GA	MSP	si	--	si
Brandes et al., 2009	95	GB	Nested MSP	si	--	--
Dunn et al., 2009	109	GB	Pirosecuenciación	si	si	si
Brandes et al., 2009	37	GB	Nested PCR	si	si	si
Clarke et al., 2009	85	GB	MSP	--	si	no
Brandes et al., 2010	38	GB	Nested MSP	--	si[8]	--

Autor / año	**n**	**Histologia**	**Método**	**Impacto de la ausencia de expresión de mRNA en la supervivencia#**		**Factor pronóstico independiente en el Análisis Multivariante ?**
				Supervivencia libre de progresión	**Supervivencia global**	
Mineura et al., 1996	18	6 GB, 8 AA, 4 GBG	RT-PCR	si	n.s	--
Rolhion et al., 1999	39	GB	RT-PCR	n.s.	n.s.	--
Tanaka et al., 2003	100	41 GB, 28 AA, 19 GBG, 12 otros	RT-PCR	--	si	no

Autor / año	**n**	**Histologia**	**Método**	**Impacto de la ausencia de expresión/ actividad de la proteína en la supervivencia#**		**Factor pronóstico independiente en el Análisis Multivariante ?**
				Supervivencia libre de progresión	**Supervivencia global**	
Belanich et	167	99 GB, 47	Inmunofluo	si [8]	si [9]	si

al., 1996		AA, 21 otros	rescencia cuantitativa			
Jaeckle et al., 1998	64	40 GB, 24 AA	Inmunofluo rescencia cuantitativa	si	si [10]	no
Chen et al., 1999	22	13 GB, 9 AA	Inmunofluo rescencia cuantitativa	n.s.	n.s	--
Silber et al., 1999	174	83 GB, 23 AA, 68 GBG	Actividad de MGMT	n.s	--	--
Anda et al., 2003	18	GB	Inmunohisto química	n.s	si	--
Andersson et al., 2004	34	GB, AA, OA, GBG	Inmunohisto química	--	n.s.	--
Nakasu et al., 2004	51	GAG	Inmunohisto química	--	si	si
Brell et al., 2005	93	75 AA, 18 OA y OAA	MSP	n.s	n.s	si
			Inmunohisto química	n.s	si [11]	si
McLendon et al., 2005	46	O, OA	Inmunohisto química	n.s.	n.s.	--
Chinot et al., 2007	28	GB	Inmunohisto química	si	si	--
Nagane et al., 2007	19	GB recurrentes	Western blot	si	si	si
Nakasu et al., 2007	28	GBG	Inmunohisto química	si [12]	no	no
Wager et al., 2008	296	169 GB, 69 GA, 51 GBG, 7 otros	Inmunohisto química	--	no	no
Capper et al., 2008	162	36 GBG, 51 GA, 75 GB	Inmunohisto química	--	si	--
Nakagawa et al., 2008	31	GB	Inmunohisto química	--	si	si
Kanamori et al., 2009	56	O, OA, OA y OAA	Inmunohisto química	no	si	no
Cao et al., 2009	73	GB	MSP	--	si	si
			Inmunohisto qímica			
Karayan-Tapon et al., 2009	71	GB	Inmunohisto química	no	no	no
Rivera et al., 2010	225	GB	RT-PCR Cuantitativa	si	si	si
Spiegl-Kreinecker et al., 2010	71	GB	MSP	--	si[10]	si[10]
			Western Blot			

Sonoda et al., 2010	62	GB	Western Blot Inmunohisto química	si	no	si

N: número de pacientes. # Sólo considerado nivel de significación estadística p< 0.05. GB: Glioblastoma; AA: astrocitoma anaplásico; OA: oligodendroglioma anaplásico; OAA: oligoastrocitoma anaplásico; GBG: glioma de bajo grado; GAG: glioma de alto grado; --: dato no disponible; n.s.: no significativo; MSP, PCR específica de metilación("*methylation specific PCR*"); RT-PCR: "*reverse-transcription PCR"*
[1] Diferencias estadísticamente significativas en el análisis multivariante para la supervivencia libre de progression. La hipermetilación del promotor es factor de mal pronóstico en esta serie.
[2] Tendencia hacia la significación estadística para los GB con hipermetilación del promotor.
[3] Diferencias estadísticamente significativas sólo para GB.
[4] Diferencias estadísticamente significativas sólo para AA.
[5] MS-MLPA: "*Methylation specific-multiplex ligation-dependent probe amplification"*
[6] Estadísticamente significativas sólo para supervivencia libre de progresión.
[7] La hipermetilación del promotor es factor de mal pronóstico en esta serie.
[8] Sólo factor pronóstico en a primera cirugía, no en la reintervención.
[9] Diferencias estadíaticamente significativas para toda la serie y para GB.
[10] Diferencias estadísticamente significativas sólo para pacientes menores de 60 años.
[11] Diferencias estadísticamente significativas sólo para los pacientes que recibieron quimioterapia.
[12]Diferencias estadísticamente significativas para supervivencia hasta la transformación maligna, siendo la supervivencia libre de transformación maligna superior para los tumores que expresaban MGMT.

Dado que la metilación del promotor y la expresión proteica de MGMT paracen depender del grado histológico y del subtipo de glioma, la relevancia de MGMT en cada uno de estos continua siendo motivo de debate (Weller et al., 2010).

En lo que se refiere al glioblastoma, a pesar de no ser pocas las series que demuestran una ausencia de valor pronóstico de MGMT, y de algunas otras cuestiones abiertas que deben todavía ser aclaradas (Blanc et al., 2004; Brandes et al., 2010; Paz et al., 2004; Spiegl-Kreinecker et al., 2010), se acepta en términos generales y así lo apoyan los resultados de importantes ensayos clínicos randomizados, que la metilación del promotor de *MGMT* determinada por MSP se relaciona de manera estadísticamente significativa con la supervivencia global y/o libre de progresión en estos tumores (Tabla I.10.) (Balaña et al., 2003; Esteller et al., 2000; Hegi et al., 2004; Hermisson et al., 2006; Kamiryo et al., 2004; Reardon et al., 2006; Rivera et al., 2010; Stupp et al., 2005; Weller et al., 2009).

Más aún, algunos estudios como el realizado por Hegi et al. (Hegi et al., 2005) demuestran que la metilación del promotor confiere *per se* una ventaja pronóstica incluso al subgrupo de pacientes que reciben exclusivamente tratamiento radioterápico, aunque no de manera tan evidente como al de los pacientes que reciben quimioterapia.

Por todo ello, algunos autores afirman que el estado de metilación de *MGMT* es, hoy por hoy, el factor molecular conocido con valor pronóstico más sólido en el glioblastoma (Weller et al., 2010). Simultáneamente, y de modo paradójico, otros grupos inciden en que se

trata de un factor predictivo de respuesta al tratamiento y no tanto pronóstico (Sonoda et al., 2010).

En cualquier caso, la afirmación de que el estado de metilación de *MGMT* se comporta como un factor pronóstico más relevante incluso que las variables clínicas clásicas conocidas (edad, Karnofsky etc.), y que además parece ser también un potente predictor de respuesta a los agentes alquilantes, es fundamentalmente aplicable a los glioblastomas de nuevo diagnóstico (Gorlia et al., 2008; Hegi et al., 2004; Hegi et al., 2005; Weller et al., 2009). En ellos, y a diferencia de otros gliomas, la pérdida de heterocigosidad de 10q (LOH*10q*) es altamente frecuente de modo que es probable que la pérdida de un alelo junto con la metilación en el promotor del otro tenga más repercusión sobre la expresión/actividad de MGMT que la simple metilación del promotor de un sólo alelo (Weller et al., 2010).

Sin embargo, el papel de MGMT en la recidiva del glioblastoma es mucho más cuestionado, no habiéndose hallado una clara asociación entre la supervivencia global y el estado de metilación de *MGMT* en pacientes sometidos a segunda cirugía, a pesar de recibir nuevamente tratamiento con agentes alquilantes. La coincidencia entre el estado de metilación del promotor de *MGMT* en el tumor original y en la recurrencia parece ser baja, especialmente si el primero poseía promotor metilado. Como posible causa de esta discordancia Brandes et al. (Brandes et al., 2010) señalan la posible heterogeneidad en el patrón de metilación entre distintas áreas del tumor original, tal como se expuso previamente.

Se ha sugerido además la posibilidad de que el patrón de metilación de *MGMT* y su valor pronóstico varíen durante el curso de la enfermedad (Brandes et al., 2010; Sadones et al., 2009). En este sentido, las llamadas "*cancer stem cells*" (CSC) o "células progenitoras del cancer" que pueden constituir enfermedad mínima residual tras el tratamiento radio y quimioterápico y poseen la capacidad de generar nuevos tumores, podrían ser otro motivo a considerar. Aunque son todavía datos preliminares, algunos autores han descrito CSC CD133+ caracterizadas por expresar niveles bajos de ARNm y proteina de MGMT, así como CSC CD133- con altos niveles de MGMT que, en opinión de dichos expertos, serían la causa de la resistencia al tratamiento y de la recurrencia tumoral (Beier et al., 2007; Beier et al., 2008; Martinez y Esteller, 2010).

Por ello, el estado de metilación de *MGMT* determinado en el momento del diagnóstico puede no relacionarse con la respuesta al tratamiento con agentes alquilantes en el momento de la eventual recidiva/progresión (Weller, 2010).

Algunos estudios realizados en pacientes con diagnóstico de glioblastoma y considerados largos supervivientes (supervivencia superior a 36 meses), han demostrado que el

porcentaje de tumores con metilación del promotor es significativamente mayor en este grupo. Sin embargo no todos los pacientes con larga supervivencia poseen glioblastomas con metilación del promotor, lo que sugiere que MGMT no es el único factor relevante (Krex et al., 2007).

Por otro lado, trabajos recientes apuntan la posibilidad de que el patrón de recurrencia en los glioblastomas tratados con radio y quimioterapia pueda verse significativamente influido por el estado de metilación de *MGMT*, produciéndose con mayor frecuencia fuera del campo de irradiación en los tumores con hipermetilación del promotor (Brandes et al., 2009) e incluso siendo más frecuentes los casos de pseudoprogresión entre los tumores con promotor metilado (Brandes et al., 2008). Se trata, no obstante una vez más de resultados preliminares que deben ser verificados en nuevos estudios (Wick et al., 2008).

En los gliomas anaplásicos todos estos aspectos son aún más controvertidos. En nuestra serie, la ausencia de inmunoexpresión de MGMT resultó ser factor pronóstico independiente de supervivencia global sólo en el subgrupo de pacientes tratados con quimioterapia. En el ensayo fase III randomizado NOA-04 (Wick et al., 2009) la metilación de *MGMT* demostró impacto pronóstico en la supervivencia libre de progresión en todos los pacientes de la serie, independientemente del tratamiento radio o quimioterapico administrado. Resultados similares fueron obtenidos en el ensayo de la EORTC 26951 (van den Bent et al., 2009), lo que apunta por lo tanto hacia la consideración de que en los gliomas anaplásicos, MGMT pueda comportarse más como factor pronóstico que como factor predictivo de respuesta al tratamiento.

Autores como Wick et al. (Wick et al., 2009) afirman que los gliomas anaplásicos con promotor hipermetilado podrían tener en realidad una alteración global de la capacidad de regular la metilación de ADN, originándose por ello la inactivación epigenética de múltiples genes relacionados con la radiorresistencia. Ello podría explicar que MGMT haya demostrado en algunos estudios una influencia pronóstica incluso en el subgrupo de pacientes tratados exclusivamente con radioterapia.

En los gliomas anaplásicos parece además existir una correlación entre metilación del promotor de *MGMT*, co-delección de *1p19q*, y mutaciones de *IDH1* (isocitrato deshidrogenasa 1), todos ellos factores moleculares relacionados con un pronóstico favorable, lo que permite hipotetizar que la regulación epigenética de MGMT en este subtipo histológico podría suceder fundamentalmente en un contexto patogenético específico y favorable (Weller et al., 2010).

Parece por lo tanto, que el significado clínico de la metilación del promotor de *MGMT* podría ser diferente en los gliomas anaplásicos respecto a los glioblastomas, si bien son

necesarios nuevos estudios prospectivos y diseñados adecuadamente de manera más específica para confirmar esta hipótesis (van den Bent et al., 2009).

Por último, en los gliomas de bajo grado la metilación del promotor de *MGMT* parece ser más frecuente que en los otros subtipos histológicos, oscilando en las diversas series entre el 47.5% y el 92.6 % de los casos, lo sugiere que esta alteración epigenética podría constituir un evento precoz en la progresión de los gliomas (Everhard et al., 2006; Möllemann et al., 2005).

En estos paradójicamente, la metilación del promotor de *MGMT* parece comportarse a priori como un factor pronóstico negativo (Komine et al., 2003; Zhang et al., 2008). Sin embargo, cuando Watanabe et al. (Watanabe et al., 2007) analizan su serie de gliomas de bajo grado en el momento del diagnóstico inicial y en la recurrencia descubren que, mientras que la presencia de promotor metilado se asocia de manera estadísticamente significativa a una menor supervivencia libre de progresión en el momento del diagnóstico inicial, tras la reintervención quirúrgica y el tratamiento con quimioterapia adyuvante, la metilación de *MGMT* resulta ser un factor pronóstico favorable. Estos resultados han sido reproducidos posteriormente por otros grupos (Kesari et al., 2009; Nakasu et al., 2007).

De ello cabe interpretar que en los gliomas de bajo grado, el tratamiento quimioterápico resulta indispensable para que la metilación de *MGMT* tenga influencia pronóstica; dicho de otro modo, en ausencia de tratamiento complementario, el valor pronóstico de MGMT es controvertido. Esto mismo ha sido corroborado en otros tumores de la economía sistémica (Baumann et al., 2006; Brock et al., 2003; Hayashi et al., 2002; Jesien-Lewandowicz et al., 2009; Levin et al., 2006; Park et al., 2001).

Del mismo modo que en los gliomas anaplásicos, en los gliomas de bajo grado algunos grupos han constatado la existencia de correlación entre MGMT, LOH*1p19q*, y mutaciones de *IDH1* (Möllemann et al., 2005; Sanson et al., 2009), sin que hasta la fecha se concozca la importancia biológica real de esta asociación ni la mayor o menor contribución de cada uno de los factores al pronóstico de los pacientes o a la quimiosensibilidad tumoral (Weller et al., 2010).

Mención aparte merecen los gliomas con componente oligodendroglial, debido a las peculiaridades genéticas de los mismos, a su mayor quimiosensibilidad y a su mejor pronóstico. Mientras que algunos estudios demuestran una asociación significativa entre la presencia de LOH*1p19q* y la existencia de hipermetilación del promotor de *MGMT* y/o baja expresión de MGMT (Möllemann et al., 2005; van den Bent et al., 2009), otras series no concluyen estos resultados (Watanabe et al., 2002).

Tal como se expuso en la Introducción, y con algunas excepciones, la mayoría de los estudios demuestran una menor expresión de MGMT en los tumores oligodendrogliales y una

mayor frecuencia de hipermetilación del promotor en relación a los tumores astrocitarios (Buccoliero et al., 2005; LeDoux et al., 1996; Silber et al., 1998), habiéndose descrito una baja expresión de la MGMT hasta en el 86-93% de los oligodendrogliomas (Buccoliero et al., 2005; McLendon et al., 2005).

Por último, a diferencia de lo que sucede en otros gliomas, la hipermetilación del promotor de *MGMT* no parece ser factor pronóstico independiente en éstos (Brandes et al., 2006; Watanabe et al., 2002). En nuestra serie, sólo 18 pacientes (19.4%) presentaban tumores con componente oligodendroglial lo que impide sacar conclusiones firmes al respecto.

En tumores no cerebrales el valor pronóstico de MGMT es igualmente controvertido. Sin embargo, y como puede observarse en la Tabla I.12. la frecuencia con la que la sobreexpresión de MGMT y/o la ausencia de metilación del promotor resulta factor pronóstico favorable es mayor que en las series de tumores cerebrales.

Tabla I.12.: Influencia pronóstica de MGMT en metástasis cerebrales y en otros tumores de la economía sistémica

Autor / año	n	Histologia	Método	Impacto de metilación del promotor en la supervivencia#		Factor pronóstico independiente en el Análisis Multivariante
				Supervivencia libre de progresión	Superv. global	
Tumores Digestivos						
Matsukura et al., 2001	60	Ca. hepatocelular	IHQ	--	si	si[1]
Matsukura et al., 2001	105	Ca. colorectal	IHQ	--	no	--
Matsukura et al., 2001	62	Ca. gástrico	IHQ	--	si	no
Park et al., 2001	71	Ca. gástrico	MSP IHQ	si[1]	no	no
Bae et al., 2002	149	Ca. gástrico	MSP IHQ	--	si	no
Kohya et al., 2002	74	Ca. tracto biliar	IHQ	--	si[1]	--
Lee et al., 2002	79	Colangioca.	MSP	--	no	--
Nagasaka et al., 2003	90	Ca. colorrectal	MSP IHQ	si	--	--
Matsukura et al., 2003	60	Ca. hepatocelular	IHQ	--	si	si
House et al., 2003	48	Neoplasia endocrina de pancreas	MSP	--	no	no
Kitajima et al., 2003	135	Ca.gástrico	IHQ	--	si	no
Lee et al., 2003	329	Ca.gástrico	IHQ	--	si[1]	no
Koga et al., 2005	37	Ca.tracto biliar	MSP IHQ	--	si[1]	--
Kohonen-Corish et al., 2005	176	Ca.colon	MSP	--	no	--

			IHQ			
Baumann et al., 2006	101	Adenoca. esofágico	RT-MSP IHQ	--	no	--
Ogino et al., 2007	30	Ca. colorrectal	MSP Cuantitativa	--	no	--
Chang et al., 2007	138	Ca.vesícula biliar	IHQ	--	no	no
Krtolica et al., 2007	47	Ca. colorrectal	MSP	--	no	no
Napielski et al., 2007	54	Ca.gástrico	MSP Cuantitativa	no	no	--
Deng et al., 2008	74	Ca. colorrectal	MSP	--	si	--
Zhang et al., 2008	24	Ca. colorrectal	MSO[2] IHQ	--	si	si
García et al., 2009	67	Ca.vesícula biliar	MSP	--	si	--
Chen et al., 2009	117	Ca. colorrectal	MSP	--	no	no
Supic et al., 2009	77	Ca.escamoso oral	Nested-MSP	--	no	--
Taioli et al., 2009	88	Ca.escamoso oral y faríngeo	MSP	si	si	si[1]
Kim et al., 2010	285	Adenoca. colon	Pirosecuen ciación	si	no	--
			Tumores pulmonares			
Hayashi et al., 2002	87	Adenoca. pulmonar	MSP IHQ	--	si	--
Pulling et al., 2003	237	Adenoca. pulmonar	Nested MSP	--	no	no
Brabender et al., 2003	90	Adenoca. pulmón	RT-PCR	--	si	si
Kim et al., 2005	72	Adenoca. pulmonar	MSP	no	no	no
Kim et al., 2005	61	Ca. pulmón no célula pequeña	MSP	no	no	no
Safar et al., 2005	105	Ca. pulmón no célula pequeña	MSP	no	no	no

Safar et al., 2007	180	Ca. pulmón no célula pequeña	MSP	no	no	--
Yanagawa et al., 2007	101	Ca. pulmón no célula pequeña	MSP	--	no	--
Cooper et al., 2008	108	Ca. pulmón no célula pequeña	IHQ	--	no	no
Hoffmann et al., 2009	76	Ca. pulmón no célula pequeña	MSP Cuantitativa en suero	--	no	--
Tumores mamarios						
Matsukura et al., 2001	46	Ca.mama	IHQ	si[1]	--	--
Cayre et al., 2002	107	Ca.mama	RT-PCR / IHQ	no	si	si[1]
Osanai et al., 2005	48	Ca.mama	IHQ	--	no	--
Munot et al., 2006	200	Ca.mama	MSP / IHQ	no	no	--
Melanoma						
Middleton et al., 2000	30	Melanoma	Actividad MGMT	--	no	--
Ma et al., 2003	79	Melanoma metastásico	IHQ	si	--	--
Voelter et al., 2008	34	Metástasis hepáticas de melanoma uveal	MSP / IHQ	--	no	--
Otros						
Hengstler et al., 1999	159	Ca.ovárico	Inmunofluo rescencia cuantitativa	--	no	no
Maruyama et al., 2001	98	Ca.vejiga	MSP	no	no	no
Esteller et al., 2002	84	Linfoma B	MSP / IHQ	si	si	si
Kwong et al., 2002	33	Ca. nasofaríngе	MSP	--	no	--
Chim et al., 2003	29	Leucemia promielocít.	MSP	--	no	no
Zuo et al.,	94	Ca.escamoso	MSP	si	si	si[1]

2004		de cabeza y cuello	IHQ			
Puri et al., 2005	51	Ca.escamoso de cabeza y cuello	IHQ	no	no	--
Hiraga et al., 2006	116	Linfoma B	MSP	si	si	si
Al-Kuraya et al., 2006	79	Linfoma B	MSP	--	si	si
Ohno et al., 2006	63	Linfoma B	IHQ	si	si	si
Nakamichi et al., 2007	53	Linfoma B	Nested MSP IHQ	--	no	--
Jo et al., 2007	82	Ca.cérvix	MSP	no	--	--
Martone et al., 2007	20	Ca.escamoso de cabeza y cuello	MSP	no	--	--
Lee et al., 2008	69	Ca.glándula salivar	MSP Pirosecuenciación	--	no	--
Kim et al., 2009	62	Sarcomas de partes blandas	MSP IHQ	si	si	si
De Schutter et al., 2009	46	Ca.escamoso de cabeza y cuello	MSP	no	no	--
Kulke el at., 2009	21	Tumores neuroendocrinos	IHQ	no	no	--
Lee et al., 2009	44	Linfoma B	MSP	--	si	--
Uccella et al., 2009	71	Linfoma B	MSP Cuantitativa IHQ	si	si	--
Lee et al., 2009	53	Linfoma B	MSP IHQ	no	no	--
Metástasis cerebrales						
Wu et al., 2009	97	Metástasis cerebrales de ca.pulmón	Nested-MSP IHQ	--	si	si

[1] La metilación y/o la pérdida de expresión se asociaron a peor pronóstico independientemente de recibir QT
[2] MSO : Methylation-specific oligonucleotide

Así, Cayre et al. (Cayre et al., 2002) observan que la sobreexpresión de ARNm en cáncer de mama resulta factor independiente de pronóstico favorable; Matsukura et al. (Matsukura et al., 2003) en cáncer hepatocelular, que la sobreexpresión de MGMT determinada mediante análisis inmunohistoquímico, es igualmente un factor pronóstico positivo en el análisis multivariante, y Brabender et al. (Brabender et al., 2003) que la ausencia de metilación del promotor de *MGMT* analizada mediante RT-PCR, se asocia a supervivencias significativamente mayores en cáncer pulmonar.

En la misma línea Zuo et al. (Zuo et al., 2004) demuestran en una serie de carcinomas escamosos de cabeza y cuello no sometidos a tratamiento complementario alguno tras la cirugía, que aquellos pacientes cuyos tumores mostraban sobreexpresión de MGMT y promotor no metilado, presentaban supervivencias significativamente mayores. Del mismo modo, Matsukura et al. (Matsukura et al., 2001) lo demuestran en pacientes con hepatocarcinoma, carcinoma gástrico y cáncer de mama, y Kawaguchi et al. (Kawaguchi et al., 2006) en 65 casos de sarcoma de partes blandas, en los que la presencia de promotor metilado se asoció a mayor tamaño tumoral, mayor agresividad y mayor número de recurrencias, por lo tanto a un pronóstico desfavorable.

Por el contrario Dikshit et al. (Dikshit et al., 2007), Deng et al. (Deng et al., 2008), Chen et al. (Chen et al., 2009) entre otros, no observan en sus respectivas series un impacto pronóstico estadísticamente significativo de la expresión de MGMT o del estado de metilación del promotor del gen.

Como ya se ha expuesto previamente en varias ocasiones, las verdaderas razones por las que existe esta disparidad de resultados en lo que se refiere al valor pronóstico y/o predictivo de MGMT no se conocen en la actualidad. En el capítulo II se abordará de manera exhaustiva el problema de la metodología a la hora de analizar MGMT, ya que podría al menos en parte explicar estos hallazgos.

No obstante, si se analizan por separado las series que han evaluado únicamente expresión de proteína de MGMT mediante IHQ o inmunofluoresecencia, eliminando de esta forma el factor de confusión atríbuíbe a aspectos meramente técnicos, los resultados son igualmente contradictorios (Anda et al., 2003; Andersson et al., 2004; Bae et al., 2002; Belanich et al., 1996; Jaeckle et al., 1998).

Parece claro, por lo tanto, que el problema no radica exclusivamente en aspectos metodológicos existendo otras cuestiones que merece la pena analizar, y que probablemente contribuyan a esta controversia.

En este sentido, la ausencia de expresión de MGMT en un tumor implica quimiosensibilidad, ya que sus células carecerán de la capacidad que confiere MGMT para reparar las lesiones del ADN inducidas por los agentes alquilantes. Sin embargo, cabe recordar que la metilación en posición O6 de la guanina es un paso importante en el proceso de adquisición de mutaciones durante la carcinogénesis ya que provoca la conversión de pares de bases (G:C a A:T) (Nakamura et al., 2001) bloqueando la replicación del ADN (Pegg et al., 1995). La proteína MGMT protege a las células de estas alteraciones y por tanto de mutaciones. Así, en modelos animales con ratones transgénicos, la sobrexpresión de MGMT ha demostrado resultar protectora frente a determinadas mutaciones. En humanos, la asociación entre ausencia de MGMT y la mutación de *K-ras* ha sido también constatada (Park et al., 2001).

Por todo ello, y al menos desde un punto de vista teórico, la ausencia de MGMT confiere quimiosensibilidad y por tanto se comporta como factor predictivo y pronóstico positivo, al tiempo que incrementa la susceptibilidad tumoral a adquirir nuevas mutaciones (*TP53, K-ras*) resultando desde este punto de vista un factor pronóstico negativo (Bello et al., 2004; Clark y Melki, 2002; Esteller y Herman, 2004; Gerson, 2004; Hayashi et al., 2002; Herman y Baylin, 2003; Issa, 2003; Jacinto y Esteller, 2007; Rolhion et al., 1999; Watanabe et al., 2007; Yin et al., 2003).

Otro aspecto relevante a considerar es el hecho de que la hipermetilación puede producirse simultáneamente en varios genes que posean igualmente promotores con islas CpG (Kohya et al., 2002), asociándose así la metilación del promotor de *MGMT* al silenciamiento de otros genes que también podrían influir en el comportamiento biológico final de las lesiones (van den Bent y Kros, 2007). El conjunto específico de genes cuyos promotores se metilan simultáneamente en un determinado grupo de tumores ha sido denominado por algunos autores "metilotipo" (Esteller et al., 2001; Liu y Gerson, 2006; Martinez y Esteller, 2010).

Este fenómeno de metilación simultánea ha sido bien descrito en el cáncer colorrectal, denominándose fenotipo *CIMP ("CpG island methylator phenotype")* a aquel de los tumores caracterizados por poseer metilación simultánea de varios genes y un peor pronóstico (Brock et al., 2003; Jones, 1999). De modo similar, en los tumores cerebrales podría existir un conjunto de genes cuyos promotores sufrieran metilación de manera simultánea (Iafrate y Louis, 2008; Mueller et al., 2007).

Algunos autores sugieren que la hipermetilación de *MGMT* pueda ser en realidad un factor subrogado y no la causa *per se* de la variabilidad pronóstica de los pacientes (Cao et al., 2009; Capper et al., 2008; Issa, 2004; Issa, 2003; Sasai et al., 2008). Esto explicaría por qué la

metilación del promotor de *MGMT* es más frecuente en el glioblastoma secundario, de mejor pronóstico, que en el primario (Eoli et al., 2007; Nakamura et al., 2001).

Por último y a modo de reflexión, diremos que atribuir las diferencias en el pronóstico de los pacientes al estado de MGMT de manera exclusiva, debe hacerse con precaución. No sólo porque traduce una visión excesivamente simplista sino porque supone asumir implícitamente que dos tumores que se diferencian entre sí por el estado de MGMT, son idénticos en el resto de sus características genéticas, lo cual es probablemente incierto (Issa, 2003).

6.2.2. VALOR PREDICTIVO DE MGMT

Tal como se ha expuesto previamente, MGMT revierte la formación de radicales alquilo/metilo en posición O6 de la guanina (O6-meG), lesión típicamente producida en el ADN celular por los agentes alquilantes, y que induce citotoxicidad y apoptosis (Ueda et al., 2004). De este modo, MGMT contrarresta el efecto de estos fármacos confiriendo quimiorresistencia a los tumores que la expresan (Chen et al., 1992; Jaeckle et al., 1998; Kitange et al., 2008; Silber et al., 1993; Stupp et al., 2007; Yachi et al., 2008).

Por lo tanto, los tumores deficitarios de MGMT deberían ser sensibles a los agentes alquilantes, y del mismo modo, la depleción de ésta en las células tumorales resistentes podría transformarlas en quimiosensibles (Lee et al., 1996).

Algunos expertos han apuntado como hipótesis la posibilidad de que en ausencia de metilación del promotor de *MGMT*, una determinada pauta de administración del agente alquilante podría llegar a agotar las reservas de MGMT de la célula neoplásica, trasformándola así en quimiosensible (Bocangel et al., 2002; Kesari et al., 2009). Desafortunadamente este planteamiento teórico no ha podido corroborarse en la práctica clínica habiéndose demostrado en los ensayos clinicos un escaso beneficio de los regímenes intensificados de temozolomida (Clarke et al., 2009; Weiler et al., 2009) y de otras estrategias deplectivas de MGMT (Schold, Jr. et al., 2004).

Por otro lado, estudios en líneas celulares han mostrado que el estado de hipermetilación del promotor y/o la ausencia de expresión de la proteína no siempre se asocian a quimiosensibilidad (Augustine et al., 2009; Jullierat-Jeanneret et al., 2008; van Nifterik et al., 2007). Es más, Kitange et al. (Kitange et al., 2008) demuestran en cultivos celulares y en un modelo animal de xenoinjerto de glioblastoma, que el tratamiento con temozolamida provoca en

algunos casos una disminución de los niveles de MGMT hasta el agotamiento de la misma, mientras que en otros, inexplicablemente induce la expresión de la proteina. Parece por lo tanto que *MGMT* es un gen inducible pudiendo sobreexpresarse tras la administración de radio o quimioterapia (Stupp et al., 2007).

Son escasas las series que analicen específicamente el valor predictivo de MGMT (Idbaih et al., 2007), y una vez más con resultados contradictorios. Mientras que algunos autores (Berger et al., 2006; Brandes et al., 2006; Metellus et al., 2009) no encuentran correlación entre el estado de metilación de *MGMT* y la respuesta objetiva a la temozolamida (Bobola et al., 1995), otros estudios demuestran una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de MGMT y la respuesta a los agentes alquilantes (Chinot et al., 2007; Martinez et al., 2007; Spiegl-Kreinecker et al., 2010).

En cuanto a las diferencias por subtipos histológicos, Hegi et al. (Hegi et al., 2005) demuestran en su serie de glioblastomas, que los pacientes con mayor supervivencia (21.7 meses) son aquellos cuyos tumores poseen metilación del promotor y reciben tratamiento radio y quimioterápico. En concreto, aproximadamente la mitad de los pacientes con promotor metilado que recibieron tratamiento complementario fueron largos supervivientes, mientras que sólo una cuarta parte de aquellos cuyos tumores no presentaban metilación del promotor e igualmente recibieron tratamiento de radio y quimioterapia sobrevivieron más de dos años. El análisis estadístico no permitió, sin embargo discernir cuál de los dos factores (tratamiento quimioterápico o metilación del promotor) tenía mayor influencia.

Crinière et al. (Crinière et al., 2007), confirman estos resultados en una serie de 219 glioblastomas, y sin embargo sostienen que la metilación del promotor *per se*, en ausencia de tratamiento complementario quimioterápico puede ser un factor de mal pronóstico y asociarse a una menor supervivencia.

En los gliomas anaplásicos mientras que algunos estudios muestran a MGMT como factor pronóstico independiente del tratamiento complementario (van den Bent et al., 2009; Wick et al., 2009), otros autores entre los cuales nos incluimos (Brell et al., 2005), observamos que la expresión de MGMT sólo resulta factor pronóstico independiente en el análisis multivariante si se consideran los pacientes que recibieron quimioterapia, no alcanzándose la significación estadística en el análisis de toda la serie. Desde esta perspectiva MGMT se comportaría como factor predictivo.

En los gliomas de bajo grado con componente oligodendroglial, MGMT parece ser factor predictivo de respuesta a la temozolamida (Everhard et al., 2006; Levin et al., 2006).

A pesar de toda la controversia, lo que si parace claro es que la respuesta a la quimioterapia de los tumores con promotor no-metilado es ampliamente heterogénea, y que tal como se expuso previamente, no existe una correlación sólida entre quimiosensibilidad y MGMT en la recidiva de glioblastoma (Brandes et al., 2006; Brandes et al., 2010; Sadones et al., 2009).

Los resultados obtenidos al respecto en tumores no cerebrales, no difieren de lo hasta ahora expuesto para los gliomas, tal y como puede observarse en la Tabla I.12. Así, mientras que en el cáncer colorrectal o en el linfoma difuso de célula grande (Hiraga et al., 2006) la metilación del promotor de *MGMT* no parece conferir quimiosensibilidad *per se* (Kawate et al., 1998; Kawate et al., 2000), Ma et al. (Ma et al., 2003) encuentran una asociación estadísticamente significativa entre la respuesta a la quimioterapia y la inmunoexpresión de MGMT en una serie de melanomas.

Todo estos datos apuntan hacia la idea de que MGMT es probablemente un factor predictivo de respuesta a los agentes alquilantes, aunque no exclusivo (Buckner et al., 2001; Chakravarti et al., 2006; Passagne et al., 2006; Riemenschneider y Reifenberger, 2009), y de que muy probablemente existen otros factores que intervienen de manera decisiva en la quimiosensibilidad tumoral (Middleton et al., 2000; Weller et al., 2010).

La investigación llevada a cabo en los últimos años por algunos grupos ha permitido aclarar algunas cuestiones al respecto. Así, hoy conocemos que los radicales O6-meG (lesiones del ADN promutagénicas y carcinogénicas) sólo se comportan como citotóxicas en presencia de actividad del sistema MMR ("*Mismatch Reapair System*"). El sistema MMR es capaz de reconocer y reparar la inserción o delección erróneas de bases durante la replicación y recombinación del ADN, así como de reparar también algunas formas de lesión del ADN. En ausencia de MGMT, los radicales O6-meG persistentes en la célula, son reconocidos por este sistema asociándose a una timina durante la replicación en el ADN. Esta unión dará lugar a ciclos de reparación infructuosos, produciéndose lesiones irreversibles del ADN y activación de la apoptosis celular. Por lo tanto, la metilación del promotor de *MGMT* y/o la ausencia de expresión de MGMT sólo conferirá quimiosensibilidad a un tumor en presencia del sistema MMR activo, ya que incluso en gran número los radicales O6-meG, si bien pueden ser altamente mutagénicos, no resultan citotóxicos *per se* (Liu y Gerson, 2006).

Por ello, en tumores con MMR competente, la resistencia a los agentes alquilantes estaría determinada por la actividad de MGMT, mientras que aquellos tumores con deficiencias en la vía MMR podrían ser quimiorresistentes independientemente de la actividad de MGMT (Augustine et al., 2009; Bignami et al., 2000; Chakravarti et al., 2006; Hermisson et al., 2006;

Wagner et al., 2007). Estudios en líneas celulares de fibroblastos, han demostrado incluso que mutaciones de MMR pueden ser más determinantes en la resistencia a la temozolamida que el estado de metilación del promotor de *MGMT* (Issa, 2003; Kokkinakis et al., 2001; Takagi et al., 2003).

Es más, la coincidencia en un glioblastoma tratado de hipermetilación del promotor de *MGMT* y de deficiencias del sistema MMR, puede influir de manera decisiva en el patrón y en la frecuencia de las mutaciones adquiridas por el tumor, y por lo tanto en el comportamiento biológico final del mismo. Así por ejemplo, en ausencia de MGMT, y por tanto de la capacidad de reparación de lesiones adquiridas del ADN, el tratamiento con agentes alquilantes puede originar la aparición en el tumor de mutaciones características en el propio sistema MMR transformándolo en incompetente (*MMR- defective hypermutator phenotype*), y *por ende* adquiriendo el tumor quimiorresistencia a pesar de no poseer MGMT (Metellus et al., 2009; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

Por último, otro aspecto a considerar es que, aunque MGMT juega un papel crítico en la resistencia tumoral a los agentes alquilantes, existen otras vías reparadoras del ADN que actúan a este mismo nivel (Pegg et al., 1995).

7. CONCLUSIONES

El valor pronóstico y predictivo de la expresión de MGMT y/o de la metilación del promotor de *MGMT* en los gliomas anaplásicos continua siendo controvertido en la actualidad, así como motivo de debate, si su relevancia en el comportamiento biológico del tumor y en la evolución clínica de los pacientes es idéntica en los distintos subtipos histológicos.

Considerar MGMT como el único factor molecular relevante en la quimiosensibilidad y en el comportamiento evolutivo de un tumor es un exceso de simplificación, ya que implica la asumción de que los dos tumores que se diferencian entre sí por la expresión de MGMT o por el estado de metilación del promotor de *MGMT* son idénticos en el resto de sus características.

Hoy por hoy, la determinación del estado de MGMT proporciona información pronóstica aunque la toma de decisiones en la práctica clinica diaria no debe basarse en los resultados de este análisis. Al carecer en la actualidad de una alternativa terapéutica suficientemente contrastada para los pacientes con tumores cuyo perfil molecular sugiere que no se beneficiarán del tratamiento quimioterápico estándar, no tratarlos no resultaría aceptable fuera de un ensayo clínico, por lo que por el momento deben tratarse de acuerdo a los protocolos comunes. Sin embargo en los ensayos clínicos, el estado de MGMT debe ser considerado para estratificar a los pacientes, o como criterio de inclusión/exclusión, ya que esto permitirá profundizar en el estudio del papel de MGMT en los gliomas.

Es necesario un mejor conocimiento del impacto clínico real de MGMT en los tumores y de los mecanismos biológicos que determinan su actividad, así como una estandarización y optimización de las técnicas de laboratorio para su análisis.

Capítulo II

EXPRESIÓN DE LA PROTEINA O6-METILGUANINA - ADN METILTRANSFERASA VALORADA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA EN TUMORES CEREBRALES Y SISTÉMICOS: REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN CON LOS RESULTADOS DE LA PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los agentes alquilantes forman parte del tratamiento quimioterápico en numerosos tipos de cáncer humano entre los cuales se encuentran los gliomas. Estos compuestos inducen, tal como su nombre indica fenómenos de "alquilación", esto es, introducen radicales "alquilo" en las células neoplásicas originándose, como consecuencia de los mismos, enlaces entre las cadenas de ADN que resultan letales para la célula (como sucede en el caso de las nitrosoureas), o bien fragmentación del ADN por fracaso en los mecanismos de reparación del mismo (como sucede en el caso de la temozolamida) (Bae et al., 2002; Esteller et al., 1999; Gerson, 2002; Jaeckle et al., 1998).

La proteína celular O^6-Metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) es, tal como se ha expuesto ampliamente en el capítulo I, una proteína reparadora del ADN capaz de eliminar los radicales mutagénicos y citotóxicos de la posición O^6 de la guanina. Por ello, en presencia de MGMT activa la toxicidad de los agentes alquilantes se reduce de manera importante, haciéndose las células tumorales quimiorresistentes. De este modo, se cree en la actualidad, que MGMT confiere quimiorresistencia a un amplio espectro de tumores en el humano.

En los tumores cerebrales la inactivación completa o parcial del gen *MGMT,* y por tanto la ausencia o disminución de la expresión de la proteína, no parece deberse a mutaciones ni delecciones sino a fenómenos epigenéticos, el principal de los cuales es la hipermetilación de las islas CpG del promotor (Baylin y Herman, 2000; Esteller et al., 1999; Jones y Laird, 1999; Robertson y Jones, 2000). De este modo, aquellos tumores en los que se produzca un silenciamiento epigenético de *MGMT*, mostrarán, al menos en un plano teórico, mayor quimiosensibilidad.

Además de su implicación en la sensibilidad a los agentes alquilantes, algunos estudios han demostrado que en los pacientes con diagnóstico de glioblastoma, glioma anaplásico o glioma de bajo grado, el silenciamiento epigenético de MGMT se comporta en sí mismo como factor pronóstico (Crinière et al., 2007; Esteller et al., 2000; Everhard et al., 2006; Hegi et al., 2004; Hegi et al., 2005; Kamiryo et al., 2004; Watanabe et al., 2005). Por ello es recomendación de los expertos actualmente que en todos los ensayos clínicos sobre gliomas, los pacientes sean estratificados en base al estado de MGMT (Gorlia et al., 2008; Sadones et al., 2009).

Existen un amplio número de métodos y protocolos de laboratorio aplicables al estudio de MGMT, sin que haya hasta la fecha consenso sobre cuál de ellos es el más adecuado para su uso rutinario (Karayan-Tapon et al., 2010; Shaw et al., 2008).

La técnica de PCR- específica de metilación o MSP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*) es la técnica más comúnmente empleada, hecho motivado en parte, porque en el primer estudio relevante sobre la influencia pronóstica del estado de metilación de *MGMT* en glioblastomas fue la técnica utilizada (Hegi et al., 2005).

Sin embargo, la MSP adolece de problemas metodológicos que limitan de manera clara su aplicabilidad en la rutina diagnóstica de la práctica clínica diaria: es relativamente compleja y larga de realizar y requiere de material tumoral de alta calidad (Preusser et al., 2008; Yip et al., 2008).

Además de con MSP, el estado de MGMT también puede ser valorado mediante el análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína. La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica fiable, muy empleada en diagnóstico histopatológico, y disponible en la mayoría de los laboratorios de nuestro entorno. Resulta además en comparación con otras técnicas, más sencilla, más económica y más rápida (Andersson et al., 2004; Capper et al., 2008; Chinot et al., 2007; Friedman et al., 1998; Idbaih et al., 2007; Jeuken et al., 2007; McLendon et al., 1998; Pollack et al., 2006; Preusser et al., 2008; Rodriguez et al., 2008) por lo que ha sido la técnica más utilizada para el estudio de la expresión proteica de MGMT en la última década (Yachi et al., 2008). Del mismo modo que con el estado de metilación del promotor, algunos trabajos retrospectivos han demostrado una influencia pronóstica de la expresión proteica y/o de la actividad de enzimática de MGMT en los pacientes con gliomas.

Paradójicamente y, en contra de lo esperable, los estudios dirigidos a evaluar la correlación entre metilación del promotor y expresión de la proteína han llegado a conclusiones contradictorias tanto en las series de tumores cerebrales como en otro tipo de neoplasias. Nuestro grupo evaluó la correlación entre los resultados de ambas técnicas en una serie de pacientes con diagnóstico de glioma anaplásico. Mientras que nuestros resultados, coincidentes con los de otros autores, mostraron que la concordancia entre el estado de metilación del promotor de *MGMT* determinado mediante MSP y la expresión de la proteína MGMT analizada por IHQ no es absoluta (Brell et al., 2005), otros estudios han demostrado una fuerte correlación entre la inmunoexpresión positiva y homogénea de la proteína y la ausencia de metilación del promotor (Ingold et al., 2009; Karayan-Tapon et al., 2010), por lo que hasta la fecha, tal como se ha expuesto en el capítulo I, persiste la controversia a este respecto.

En los últimos años el avance en el conocimiento sobre marcadores moleculares tumorales está revolucionando la práctica clínica. Un profundo entusiasmo inunda todo lo relacionado con la investigación entorno al diagnóstico y al pronóstico del cáncer.

Sin embargo, las llamadas "Reglas de Evidencia" en los estudios relacionados con pronóstico no están tan desarrolladas ni establecidas como en los trabajos relacionados con terapéutica y por ello, problemas importantes amenazan la "validez" y "reproducibilidad" de estos.

La corriente denominada "medicina basada en la mejor evidencia" ("*best evidence based medicine*") ha impregnado desde los años 70 el ámbito del desarrollo de la metodología para la toma de decisiones clínicas, de modo que se ha convertido en objetivo primordial el que la actividad médica asiente sobre bases científicas contrastadas.

Es importante tener en cuenta que la investigación basada simplemente en descubrimientos puede llevar a sobredimensionar los resultados (Ransohoff, 2004), por lo que el primer paso a la hora de validar los resultados de un determinado estudio es evaluar si estos son reproducibles y, desafortunadamente, esto no siempre es llevado a cabo de manera rigurosa (Ntzani y Ioannidis, 2003).

Un ejemplo de todo lo anteriormente expuesto es precisamente MGMT. No existe hasta la fecha evidencia fundamentada sobre la que basar recomendaciones específicas respecto al método idóneo para su análisis, y existe por ello una fuerte necesidad de realizar comparaciones sistemáticas y validación de la reproducibilidad intra e inter-laboratorio de las diferentes técnicas aplicables para su estudio. Sólo de este modo será posible clarificar si existe o no concordancia entre ellas, e identificar la metodología idónea para el análisis rutinario de MGMT en la clínica (Preusser, 2009). Y dado que es probable que en un futuro no muy lejano se decida la pauta terapéutica adecuada para cada paciente en función de los resultados obtenidos del análisis de MGMT, no se trata de un hecho sin importancia, sino que resulta esencial que dicha información sea precisa y reproducible.

En cualquier ámbito de la investigación biomédica la posibilidad de concluir resultados sesgados o imprecisos incrementa cuando estos se obtienen a partir de pocos estudios o a partir de estudios realizados sobre cohortes de pequeño tamaño. En este sentido las Revisiones Sistemáticas resultan de enorme utilidad y en algunas ocasiones la única forma de llegar a obtener información de valor. Las Revisiones Sistemáticas de la evidencia científica consisten en la síntesis de la mejor evidencia disponible para, mediante la aplicación de una metodología rigurosa y explícita, intentar responder a una pregunta concreta (Riley et al., 2009). El procedimiento de revisión de publicaciones y conocimientos ha sido utilizado desde siempre en

el ámbito de la ciencia médica, sin embargo las Revisiones Sistemáticas no se limitan a una mera revisión narrativa, sino que consisten en un a análisis de la bibliografía sobre el tema de interés siguiendo una metodología rigurosa y reglada, similar en alguna medida a la que se utiliza en un estudio de investigación básica, de ahí la denominación "Sistemática". La metodología estadística que se aplica para el análisis de las Revisiones Sistemáticas es el llamado Meta-análisis. Este define los procedimientos cuantitativos de análisis de los datos extraídos de los trabajos de investigación revisados, con el fin de obtener conclusiones estadísticas sobre el objeto de la revisión.

El objetivo de todo Meta-análisis es doble, por un lado pretende hacer una estimación media global de la cantidad medida, en el presente capítulo la "cantidad" a medir será la precisión diagnóstica de la IHQ y, por otro lado, todo Meta-análisis analiza la heterogeneidad hallada entre los diferentes estudios y las posibles causas de la misma.

El Meta-análisis es por lo tanto un procedimiento estadístico empleado para integrar los resultados de diferentes estudios y obtener así una estimación conjunta y global de todos ellos.

Cuando en diferentes estudios se ha analizado la misma cuestión es previsible encontrar, por puro azar, diferencias entre éstos, máxime si se trata de estudios de pequeño tamaño. Al aumentar el tamaño de la muestra mediante la combinación de los estudios, se consigue mayor poder estadístico. Además, al incluirse en el Meta-análisis trabajos llevados a cabo en centros y laboratorios diferentes, los resultados obtenidos son extrapolables a un colectivo más amplio de pacientes.

Las Revisiones Sistemáticas sobre la precisión de un test diagnóstico constituyen un tipo particular de Revisión Sistemática. Permiten obtener estimaciones muy precisas y reales de las propiedades diagnósticas del test objeto de análisis, así como una comparación del mismo con otro tests utilizados en la práctica clínica habitual, con el estándar de oro hasta el momento etc. Además, este tipo de Revisiones Sistemáticas permiten analizar las diferencias entre los resultados obtenidos por los diversos grupos que emplean el test objeto de análisis, y las eventuales razones de las mismas.

En aquellos casos en los que resulta estadísticamente posible, el Meta-análisis permite realizar una combinación de resultados de los diversos estudios incluidos en la revisión, obteniéndose de este modo una estimación conjunta de la precisión diagnóstica del test mucho más extrapolable y ajustada a la realidad que las obtenidas por los diversos autores de cada estudio individual.

En los casos en que por cuestiones metodológicas no resulte posible realizar la combinación de resultados de los diversos estudios, el valor de la Revisión Sistemática será

precisamente el analizar la calidad de los trabajos revisados y destacar los problemas detectados para iluminar el camino hacia el que dirigir la investigación en el futuro (Riley et al., 2009).

En resumen, el fundamento sobre el que se sustenta la realización de una Revisión Sistemática y un Meta-análisis sobre precisión de un test diagnóstico es idéntico al que subyace tras un Meta-análisis sobre estudios de efecto, esto es, obtener estimaciones de la precisión de los tests basadas en toda la evidencia disponible, evaluando la calidad de dicha evidencia.

El diagnóstico es un componente crítico de la atención sanitaria. En la rutina diaria tanto los facultativos que atienden a los pacientes, como los propios pacientes y los gestores de la sanidad se enfrentan a numerosas cuestiones relacionadas con las pruebas diagnósticas: ¿mejorará el pronóstico del paciente el uso extensivo de un determinado test?, ¿qué fiabilidad diagnóstica tiene en relación a otros test conocidos?, ¿cómo interpretar los resultados?, ¿cuál es la precisión diagnóstica de un test? y en definitiva ¿cuál es el test idóneo para incluir en las guías de práctica clínica?.

La terminología "precisión diagnóstica" de un test ("*diagnostic test accuracy*") hace referencia a la capacidad del mismo para distinguir aquellos sujetos u objetos de estudio que presentan una determinada condición, de aquellos que no la presentan. En el caso que nos ocupa el test diagnóstico debería discriminar de manera precisa aquellos tumores con metilación del promotor de *MGMT* de aquellos no metilados, porque en definitiva se trata de identificar con precisión aquellos pacientes que se beneficiarán del tratamiento con agentes alquilantes de aquellos que no lo harán.

Sin embargo, es bien sabido que la precisión diagnóstica de un test no es una propiedad fija del mismo, sino que puede variar en función del subgrupo de pacientes/tumores que se estudian, de la situación clínica, del tipo de muestra que se analiza, etc.

Todos estos factores son considerados en los Meta-análisis sobre precisión diagnóstica. En estos los resultados del test que se está evaluando (test problema, llamado "*index test*" en la literatura anglosajona), se comparan con los resultados obtenidos con el estándar de referencia sobre el mismo grupo de sujetos (Leeflang et al., 2008).

Sin embargo, la aplicación de la metodología estadística rigurosa al estudio de test diagnósticos o pronósticos es posterior en el tiempo a aplicación de la misma en estudios de tratamiento, y por este motivo todavía algunos aspectos no están perfectamente estandarizados o son motivo de debate en la actualidad (Moher et al., 2000). Es concretamente en la década de los 90 cuando se inicia el desarrollo de esta nueva metodología estadística que permite la combinación de los resultados de estudios sobre la precisión de test diagnósticos (Moses et al., 1993). En 1994 se publican las primeras guías para Meta-análisis sobre precisión de test

diagnósticos (Irwig et al., 1994). Desde entonces hasta la fecha han surgido voces críticas al tiempo que otros autores han contribuido con sus propuestas al perfeccionamiento de la metodología, y en cualquier caso, cada vez se ha hecho más relevante para la evaluación de test diagnósticos y pronósticos (Halligan, 2005).

En el presente capítulo se realiza una Revisión Sistemática y un Meta-análisis sobre la precisión diagnóstica de la IHQ, considerándola como test problema. Como test estándar se ha considerado la MSP.

2. HIPÓTESIS

Hipótesis conceptual: La concordancia entre el estado de metilación del promotor de *MGMT* y el grado de expresión inmunohistoquímica de MGMT no es absoluta, por lo que la determinación del estado de metilación del promotor de *MGMT* mediante MSP y de expresión de la proteína MGMT mediante análisis inmunohistoquímico, no seleccionan el mismo grupo de pacientes. Por todo ello, no son técnicas equivalentes e intercambiables en la rutina diaria, y los resultados de las diversas series de la literatura deben compararse con precaución si en ellas se ha empleado distinta metodología, análisis inmunohistoquímico o MSP para la valoración del estado de MGMT.

Hipótesis de trabajo: La primera hipótesis que se pretende verificar o refutar es la ausencia de una correlación absoluta entre la IHQ y la MSP para la valoración del estado de MGMT, no sólo en tumores cerebrales sino también en otras neoplasias de la economía sistémica.

En segundo lugar se pretende verificar o refutar la hipótesis de que tanto la sensibilidad como la especificidad del análisis inmunohistoquímico de MGMT son inferiores en los tumores cerebrales que en las neoplasias sistémicas.

Por último se pretende verificar o refutar la hipótesis de que la menor precisión diagnóstica de la IHQ en los tumores cerebrales no depende exclusivamente de cuestiones metodológicas sino de aspectos de la idiosincrasia de los mismos.

3. OBJETIVOS

Objetivo General: Realización de una Revisión Sistemática para evaluar la evidencia existente en relación a la correlación entre la expresión proteica de MGMT determinada mediante análisis inmunohistoquímico y el estado de metilación del promotor valorado mediante MSP, así como la realización de un Meta-análisis de precisión diagnóstica de la IHQ en relación a la MSP.

Objetivos Específicos:

1. Realización de una Revisión Sistemática sobre la concordancia entre la expresión inmunohistoquímica de MGMT y el estado de metilación del promotor de *MGMT* determinado mediante MSP, tanto en tumores cerebrales como en otras neoplasias sistémicas.

2. Realización de un Meta-análisis de precisión diagnóstica de la IHQ para evaluación de MGMT, en relación al test de referencia (MSP).

3. Valoración de la precisión diagnóstica del análisis inmunohistoquímico de MGMT, en dependencia del "umbral de positividad" o "punto de corte seleccionado ("*cut-off value")*.

4. Valoración de la precisión diagnóstica del análisis inmunohistoquímico de MGMT en tumores cerebrales en relación a las neoplasias sistémicas.

5. Identificación de las posibles fuentes de heterogeneidad en el Meta-análisis, dado que la precisión diagnóstica de un test no es una propiedad fija del mismo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

La Revisión Sistemática y el Meta-análisis se efectuaron de acuerdo a las guías publicadas en la literatura (Deville et al., 2002; Irwig et al., 1994; Leeflang et al., 2008; Virgili et al., 2009; Whiting et al., 2003) y las recomendaciones del "Grupo de Trabajo sobre Precisión de Tests Diagnósticos" ("*Diagnostic Test Accuracy Working Group",* http://srdta.cochrane.org/)

Las Revisiones Sistemáticas sobre precisión de test diagnósticos tienen como finalidad intentar responder a una pregunta clínica concreta. De la definición clara y precisa de dicha pregunta, explicitando el factor de estudio (procedimiento diagnóstico que se evalúa) y el de comparación, así como la población de estudio y las características concretas que deberán reunir los trabajos para ser incluidos en la revisión, dependerá la calidad de la misma.

A diferencia de otro tipo de estudios, en las Revisiones Sistemáticas el análisis de resultados no se realiza a partir de datos primarios, es decir, no se obtiene la información directamente de los sujetos, sino que utiliza datos procedentes de fuentes diversas, de la investigación de distintos autores etc. Es decir en los Meta-análisis la unidad de observación en lugar de ser los pacientes la constituyen los estudios.

Por lo tanto, las Revisiones Sistemáticas pueden considerarse estudios observacionales en los que la "población de estudio" está formada por los mejores artículos originales realizados sobre el tema objeto de la revisión (Argimon Pallás y Jiménez Villa, 2004).

Las etapas que incluyen las Revisiones Sistemáticas sobre rendimiento de pruebas diagnósticas, son idénticas a las de cualquier Revisión Sistemática y por ello fueron rigurosamente seguidas en nuestro estudio, tal como se detallan a continuación:

Tabla II.1. Guía para la realización de una Revisión Sistemática (Argimon Pallás y Jiménez Villa, 2004)

• Definición del objetivo (pregunta de investigación)
• Búsqueda de evidencias: - Bases de datos consultadas - Palabras clave utilizadas - Período de cobertura - Otros requisitos: idioma, revista etc.
• Criterios de inclusión y exclusión de estudios
• Evaluación de la calidad de los estudios:
- Resumen de las características esenciales de los estudios - Calificación de la calidad de los estudios - Evaluación de la variabilidad entre los investigadores que califican los estudios
• Recogida de datos: - Registro de las características de los estudios: Tipo de artículo y año de publicación Diseño del estudio Tamaño de la muestra - Registro de los resultados de los estudios
• Análisis de los resultados:
- Pruebas de homogeneidad - Combinación estadística de los resultados - Pruebas para detectar diferencias sistemáticas entre estudios - Representaciones gráficas - Análisis de sensibilidad - Análisis de subgrupos
• Conclusiones y recomendaciones

Sin embargo, la búsqueda y selección de estudios primarios para ser incluidos en una Revisión Sistemática sobre precisión de test diagnósticos es más compleja que la de las

Revisiones Sistemáticas para estudio de efectividad de una determinada intervención debido a varios motivos. En primer lugar, por la diversidad de las fuentes y la fragmentación en diferentes tipos de publicaciones de los estudios, lo que provoca que los algoritmos de búsqueda requieran mayor desarrollo, y en segundo lugar porque existe una carencia de términos de indexación apropiados para este tipo de Revisiones Sistemáticas.

Se trata a día de hoy, de un área de la estadística en desarrollo, donde no existen algoritmos estándar ni filtros específicos desarrollados, por ello, en la presente tesis se ha procurado mantener el máximo rigor y se han seguido escrupulosamente las recomendaciones de los expertos en el tema publicadas hasta el momento.

4.1. REVISIÓN DE LA LITERATURA

Se realizó una búsqueda automatizada de las principales bases de datos electrónicas: MEDLINE (periodo de tiempo de cobertura: 1950-octubre 2009), EBSCO (periodo de tiempo de cobertura: 1966-octubre 2009) y EMBASE (periodo de tiempo de cobertura: 1974-octubre 2009). Para la búsqueda se emplearon descriptores incluidos en el Encabezado de Temas Médicos (*Medical Subject Headings, MeSH*) y los correspondientes términos de entrada acompañantes (Tabla II.2).

Tabla II. 2: **Estrategia de búsqueda automatizada**

MEDLINE (a través de PubMed)
• (MGMT[All Fields] OR (O6-Methylguanine[All Fields] AND ("dna"[MeSH Terms] OR "dna"[All Fields]) AND ("methyltransferases"[MeSH Terms] OR "methyltransferases"[All Fields] OR "methyltransferase"[All Fields]))) AND (("immunohistochemistry"[MeSH Terms] OR "immunohistochemistry"[All Fields]) OR ("gene expression"[MeSH Terms] OR ("gene"[All Fields] AND "expression"[All Fields]) OR "gene expression"[All Fields] OR "expression"[All Fields]))
EMBASE
• 'mgmt' AND ('immunohistochemistry'/exp OR 'immunohistochemistry') AND ('expression')
EBSCO
• ((mgmt or O6 METHYLGUANINA DNA METHYLTRANSFERASE) and (EXPRESSION or IMMUNOHISTOCHEMISTRY)).af.

A fin de identificar estudios adicionales publicados, no publicados o en marcha en el momento de la búsqueda, se introdujeron en PubMed los estudios más relevantes empleándose a continuación la función de "Artículos Relacionados" ("*Related Articles*").

Se revisó la base de datos "*Science Citation Index"*, para identificar todas las citas bibliográficas de las publicaciones relevantes.

La búsqueda ee completó manualmente revisando el listado de referencias bibliográficas de todos los trabajos seleccionados.

Sólo se consideraron elegibles los trabajos publicados en el idioma inglés.

La búsqueda de estudios para ser incluidos en la revisión, fue llevada a cabo por 2 autores de manera independiente, y las discrepancias se resolvieron por consenso.

4.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE LOS ESTUDIOS

Los criterios para la inclusión y exclusión de los estudios fueron los siguientes:

1. Fueron incluidos aquellos estudios en los que se comparaba sobre la misma cohorte de casos, la expresión de la proteína MGMT determinada mediante análisis inmunohistoquímico, con el estado de metilación del promotor del gen *MGMT* determinado mediante PCR específica de metilación (MSP), considerándose éste como test de referencia.

2. No sólo se incluyeron series de tumores cerebrales sino que también fueron incluidos en la revisión sistemática y posteriormente analizados, estudios realizados sobre cualquier tipo de neoplasia sistémica, siempre que cumplieran el primer criterio de inclusión.

3. Sólo se incluyeron aquellos estudios en los que estuviera disponible la información necesaria para construir las tablas de contingencia de 2x2 con sus 4 casillas: verdaderos positivos, falsos negativos, falsos positivos y verdaderos negativos.

4. Quedaron excluidos los estudios realizados sobre líneas celulares o modelos animales.

5. Quedaron excluidos los estudios publicados en lengua no inglesa.

4.3. TEST PROBLEMA ("*INDEX TEST*") Y TEST DE REFERENCIA ("*REFERENCE TEST*")

La IHQ realizada con los distintos anticuerpos comerciales disponibles en el mercado constituyó el test bajo evaluación o test problema, mientras que la MSP fue considerada como test de referencia o estándar, debido a que es el más comúnmente usado y considerado como tal por los expertos, y además es el que ha demostrado valor pronóstico en los gliomas (Hegi et al., 2005).

4.4. VALORACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS ESTUDIOS SELECCIONADOS

Idealmente sólo deberían incluirse en una Revisión Sistemática aquellos estudios con una calidad mínima suficiente que cumplan los requisitos y los criterios de inclusión establecidos de antemano, para de este modo asegurar la validez de los resultados.

En el caso concreto de las Revisiones Sistemáticas sobre precisión de test diagnósticos, la calidad hace referencia a ciertos aspectos relacionados con el diseño y la ejecución de los estudios, como son la adecuada especificación de la población incluida, la descripción de las técnicas diagnósticas evaluadas y el modo en que se efectúa la interpretación de las mismas, y los mismos detalles en relación al test de referencia empleado.

Lógicamente, la evaluación de la calidad es un proceso subjetivo. La literatura referente a la evaluación de calidad en este tipo de Revisiones Sistemáticas disponible hasta la fecha, es una vez más escasa en comparación a relacionada con las Revisiones Sistemáticas sobre efectividad de intervenciones. Sin embargo en los últimos años han surgido algunas herramientas de evaluación de calidad específicas como son la evaluación QUADAS ("*Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies*") (Whiting et al., 2003; Whiting et al., 2006) y la STARD ("*Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*") (Bossuyt et al., 2003) (Anexos IV y V)

La evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos en la presente revisión sistemática, fue realizada de manera independiente por dos observadores de acuerdo a la escala QUADAS que fue específicamente diseñada para las Revisiones Sistemáticas sobre precisión de tests diagnósticos.

Se trata de una escala constituida por los 14 ítems que se detallan a continuación, y que se evalúan como "si", "no", o "incierto" de acuerdo a la correspondiente interpretación de cada uno de ellos (Whiting et al., 2003):

1. ¿Es el espectro de pacientes representativo?

Determinados aspectos relacionados con la demografía o las características clínicas de la población de estudio pueden condicionar de manera considerable la precisión diagnostica del test, pudiéndose originar el llamado "sesgo de espectro" ("*spectrum bias"*) en caso de existir diferencias significativas entre las poblaciones de los diversos grupos incluidos. En caso de producirse este sesgo quedaría limitada la generalización de los resultados y por lo tanto la aplicabilidad clínica del test.

En la presente Revisión Sistemática, se definió como espectro representativo cualquier cohorte de pacientes tanto con diagnóstico de tumor cerebral como de cualquier otra neoplasia sistémica, sobre la que se hubiera analizado de manera simultánea la expresión inmunohistoquímica de MGMT y el estado de metilación del promotor de *MGMT* mediante MSP.

2. ¿Se describen de manera clara los criterios de selección?

Este ítem hace referencia al hecho de si los autores de los diversos estudios incluidos explicitan de manera detallada, los criterios de inclusión y exclusión de pacientes en el mismo.

Dado el tipo de estudios originales que constituyen la presente Revisión Sistemática, se consideraron como criterios de selección claramente descritos, los de aquellos en los que la relación de centros participantes en el estudio se expresaba claramente en el apartado de metodología del trabajo, tal como se ha descrito previamente (Leeflang et al., 2008).

3. ¿Se ha empleado el test de referencia estándar?

El test de referencia es aquel empleado para determinar la presencia o ausencia de la condición estudiada. En la presente revisión sistemática, el test considerado como estándar fue la MSP. Dado que hasta la fecha, existe escasa información sobre la viabilidad del empleo en la práctica clínica de técnicas basadas en análisis de ADN diferentes a la MSP (Preusser, 2009), este ítem fue valorado como "incierto" en todos aquellos estudios que emplearon como test de referencia cualquier tipo de modificación sobre la MSP original.

4. ¿Es el intervalo de tiempo transcurrido entre la realización del test de referencia y del test problema suficientemente breve como para estar razonablemente seguro de que la condición estudiada no ha sufrido modificación entre ambos?

Idealmente los resultados del test problema y del test de referencia deberían obtenerse simultáneamente para evitar el llamado "sesgo de progresión" ("*disease progression bias")*. En el caso de los gliomas de alto grado, tal como se ha expuesto en el capítulo I, existe la posibilidad de que el patrón de metilación del promotor de *MGMT* varíe durante el curso de la enfermedad (Beier et al., 2007; Beier et al., 2008; Brandes et al., 2010; Martinez y Esteller, 2010; Sadones et al., 2009). De este modo, el estado de metilación de *MGMT* determinado en el

momento del diagnóstico podría no coincidir con el determinado en el momento de la recidiva/progresión (Weller, 2010).

Por este motivo, sólo se incluyeron en el Meta-análisis aquellos estudios en los que los resultados del test de referencia y del test problema procedentes de un mismo tumor, hubieran sido obtenidos de manera simultánea, en el mismo momento evolutivo de la enfermedad.

5. ¿Fue toda la muestra verificada mediante el test estándar o sólo una selección aleatoria de la misma?

Se produce el llamado "sesgo de verificación parcial" también llamado "sesgo de selección" ("*partial verification bias*") cuando el test estándar o de referencia no se aplica a toda la muestra. En el caso que nos ocupa, cuando era expresado claramente en el apartado metodológico del trabajo que todos los casos sobre los que se efectuó análisis inmunohistoquímico fueron también analizados mediante MSP, este ítem fue valorado como "si".

Debido a la complejidad técnica de la MSP, al requerimiento de tejido tumoral en buen estado, de personal entrenado etc., en algunos estudios no se pudo realizar valoración mediante MSP para el total de tumores evaluados mediante IHQ o el resultado obtenido de la prueba resultó no concluyente en algunos de los tumores analizados. En estos casos por lo tanto, no pudo evitarse de manera absoluta un cierto sesgo de verificación y *por ende* en estos trabajos, el ítem fue evaluado como "no".

Finalmente, cuando el número de resultados obtenidos procedentes del análisis inmunohistoquímico no coincidía con en número de resultados procedentes de la MSP, pero los autores no explicitaban los motivos por lo que existía esta diferencia, el ítem fue valorado como "incierto"

6. ¿Fue toda la muestra verificada mediante el mismo test de referencia independientemente de los resultados obtenidos con el test problema?

Se produce un "sesgo de verificación diferencial" ("*differential verification bias*") cuando los resultados del test problema son verificados con test de referencia diferentes y especialmente si la definición de la condición a estudio no coincide en los dos test de referencia. En nuestro análisis, cuando el test estándar fue el mismo para toda la población de estudio se valoró como "si". Si se emplearon diferentes test de referencia se valoró como "no", y en

aquellos casos en los que no se dispuso de información precisa al respecto el ítem fue evaluado como "incierto".

7. ¿Es el test de referencia independiente del test problema?

Este ítem no fue evaluado en el presente Meta-análisis dado que el test problema no forma parte del test de referencia.

8. ¿Se describe la ejecución del test problema con suficiente detalle como para resultar reproducible?
9. ¿Se describe la ejecución del test de referencia con suficiente detalle como para resultar reproducible?

No sólo se evaluó si la ejecución del test problema y del test de referencia se describían con suficiente detalle como para resultar reproducibles, sino que además se recogió el tipo de anticuerpo comercial empleado, el umbral de positividad o punto de corte ("*cut-off value*") elegido para la valoración de la inmunoexpresión, y si el tratamiento conversor con bisulfito de las muestras había sido llevado a cabo con la ayuda de algún kit comercial.

10. ¿Fueron interpretados los resultados del test problema sin conocimiento previo de los resultados del test de referencia?
11. ¿Fueron interpretados los resultados del test de referencia sin conocimiento previo de los resultados del test problema?

Concepto equivalente al "doble ciego" en los estudios de intervención. El conocimiento previo de los resultados del test de referencia puede condicionar e influir la interpretación de los resultados del test problema, produciéndose entonces el llamado "sesgo de revisión" ("*review bias*").

En la presente revisión este ítem fue valorado como "si" cuando los autores de los estudios explicitaban que la valoración inmunohistoquímica se había efectuado a ciegas del resultado de la MSP y viceversa.

12. La información clínica necesaria para la interpretación del test problema ¿estará fácilmente disponible si se incorpora el test a la práctica clínica rutinaria?

Este ítem no fue considerado en la presente Revisión Sistemática debido a que en nuestro caso, la disponibilidad de información clínica no afecta a la interpretación de la IHQ.

13. ¿Se reportaron los resultados no interpretables o imprecisos?

Es frecuente que en los estudios sobre precisión de un test diagnóstico los resultados no-interpretables o imprecisos no se reporten y simplemente se eliminen del análisis. Sin embargo, esto puede conllevar una valoración sesgada de las características del test.

Como ya se ha expuesto en el Capítulo I, un porcentaje no desdeñable de muestras de parafina resultarán tras su procesamiento, en un ADN de calidad sub-óptima y en un resultado infructuoso de la MSP. Así, en el estudio de Hegi. et al. (Hegi et al., 2005), el estado de metilación de *MGMT* pudo sólo determinarse en el 67% de las muestras disponibles y en el 37% del total de pacientes incluidos en el estudio.

En el caso que nos ocupa, el ítem se valoró como "si" si se reportaban de manera explícita y detallada el porcentaje de resultados válidos y el número de resultados no concluyentes obtenidos.

14. ¿Se explicaron adecuadamente las razones por las que se retiraron sujetos del estudio en caso de producirse?

En caso de existir pérdida de casos en los estudios, se evaluó si los motivos por los cuales esto se produjo eran o no convenientemente explicados por los autores ya que la eliminación de sujetos y su exclusión del análisis pueden constituir otro motivo de sesgo.

En la Tabla II.3. se exponen de manera resumida los principales sesgos de las Revisiones Sistemáticas sobre estudios de precisión de tests diagnósticos, y las causas por las que éstos se producen:

Tabla II.3. Potenciales sesgos en los trabajos sobre precisión de tests diagnósticos, principales fuentes de los mismos y consecuencias que de ellos pueden derivarse (Modificado de Leeflang et. al (Leeflang et al., 2008)**)**

Tipo de sesgo y fuente del mismo	¿Cuándo sucede?	¿Provoca sobrestimación o infraestimación de la precisión diagnóstica del test?
Pacientes		
Sesgo de espectro	Los pacientes incluidos no son representativos	Variable
Sesgo de selección	Los pacientes no son incluidos de manera aleatoria	Sobrestimación
Test problema		
Sesgo de revisión	Cuando la interpretación de resultados del test problema se hace conociendo los resultados del test de referencia	Sobrestimación
Test de referencia		
Sesgo de clasificación	Cuando el test de referencia no clasifica correctamente la condición estudiada	Variable
Sesgo de verificación diferencial	Cuando se emplea más de un test de referencia	Sobrestimación
Sesgo de incorporación	Cuando el test problema forma parte del estándar	Sobrestimación
Sesgo de progresión de la enfermedad	Cuando la condición de estudio cambia desde la realización de uno de los test a la del otro	Variable
Sesgo de revisión	Cuando los resultados del test de referencia se interpretan conociendo los del test problema	Sobrestimación
Análisis de datos		
Datos excluidos	Cuando los resultados no interpretables e imprecisos y las pérdidas no se consideran en el análisis	Sobrestimación

La manera en la que la calidad de los estudios determinada por la puntuación obtenida en la escala QUADAS debe ser tenida en cuenta para el análisis posterior, es motivo de controversia en la actualidad. Dicho de otro modo, la utilidad real del análisis de calidad más allá de la mera descriptiva es todavía debatido por los expertos en este tipo de revisiones. Una aproximación al problema propuesta por algunos autores aunque quizás excesivamente simplista, es excluir del Meta-análisis todos los estudios de baja calidad. Como alternativa podría introducirse un factor de corrección en función de la puntuación de calidad obtenida, de modo que cada trabajo tuviera diferente "peso relativo" en el análisis estadístico. Sin embargo, debido a la incuestionable subjetividad del análisis de calidad (Berman y Parker, 2002), el peso relativo asignado a cada trabajo podría en sí mismo resultar en un sesgo por lo que, en nuestro estudio, y siguiendo las recomendaciones de los expertos, no se aplicó ningún factor de corrección para baremar los trabajos incluidos y tampoco se excluyó del análisis ningún trabajo exclusivamente por su calidad.

4.5. EXTRACCIÓN DE LOS DATOS

La extracción de los datos fue llevada a cabo por dos autores de manera independiente e incluyó para cada uno de los estudios evaluados los siguientes aspectos:

- Nombre y filiación del primer autor
- Fecha de publicación del estudio y fuente bibliográfica del mismo
- Periodo de tiempo abarcado por el estudio
- Test diagnósticos empleados y protocolo de realización de los mismos
- Población de estudio
- Punto de corte, o umbral de positividad empleado para la valoración de la IHQ
- Puntuación obtenida en la escala de calidad QUADAS
- ¿Se realizó examen histológico del tejido del cual se efectuó la extracción de ADN?
- Porcentaje de muestras con metilación del promotor de *MGMT* según la MSP
- Impacto pronóstico de MGMT en la supervivencia
- Datos para la construcción de la tabla de contingencia de 2x2

4.6. ESTATEGIA DE ANÁLISIS

Aquellos estudios en los que no se aportaban datos suficientes para la construcción de la tabla de contingencia de 2x2, no pudieron ser incluidos en el análisis.

A partir de los datos de las tablas de 2x2 se efectuó el cálculo de la sensibilidad (S), especificidad (E) y odds ratio (OR) para cada estudio. Los resultados individuales de cada estudio se representaron gráficamente del modo convencional, en los llamados "gráficos de bosque" ("*forest plot*") y "espacios ROC" ("*Receiver Operating Characteristic space*").

En los "gráficos de bosque", el resultado principal de cada uno de los estudios se muestra como una línea horizontal que representa el intervalo de confianza al 95% (IC 95%) de la precisión diagnóstica estimada, y sobre esta línea una señal que indica la estimación puntual de la precisión diagnóstica para el test, observada en dicho estudio (Argimon Pallás y Jiménez Villa, 2004).

El espacio ROC es la representación gráfica en forma de nube de puntos de (1-especificidad) frente a la sensibilidad para cada estudio.

El motivo por el que habitualmente se emplean estas dos formas de representación gráfica en las Revisiones Sistemáticas y en los Meta-análisis, es porque resultan complementarias. En las curvas ROC no suele representarse el IC de los diversos estudios, y por lo tanto, no es posible discernir en ellas posibles causas de dispersión. Por el contrario, los "gráficos de bosque" representan de manera tabular los IC de la S y la E de cada estudio individual, por lo que resulta sencillo e intuitivo valorar sobre ellos la dispersión de los resultados, sin embargo al representarse en ellos de manera separada la S y la E no reflejan de manera tan clara la relación entre ambas.

Siguiendo las guías establecidas, las pruebas de homogeneidad constituyeron el primer paso en la estrategia de análisis. Explorar la presencia de heterogeneidad resulta crucial no sólo en los Meta-análisis sobre precisión diagnóstica, sino también en cualquier otro tipo de Meta-análisis, ya que permite por una parte detectar los factores que pueden haber influido en la precisión diagnóstica del test obtenida en cada estudio individual, y además, porque resulta imprescindible antes de agrupar los resultados de los diversos estudios para realizar cualquier tipo de estimación combinada o conjunta.

Por ello en el presente trabajo, el análisis de heterogeneidad se realizó en primera instancia mediante la inspección visual de las representaciones gráficas de los estimadores en los "gráficos de bosque" y "espacios sROC".

Posteriormente, se emplearon el test de la chi-cuadrado y el test de la Q de Cochrane para valorar si la variabilidad entre los estudios era o no superior a las esperable por azar. Un resultado estadísticamente significativo en estos tests implica la presencia de heterogeneidad estadística (variabilidad más allá de lo esperable por azar).

Posteriormente se efectuó el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman entre el logit de la sensibilidad y el logit de 1-especificidad. La obtención de un resultado de asociación estadísticamente significativo entre ambos parámetros indica la presencia de "efecto umbral" como causa principal de la heterogeneidad. La definición de "efecto umbral", las posibles causas y consecuencias del mismo etc. serán expuestas a continuación.

Así mismo se efectuó el cálculo del "índice de inconsistencia" (I-cuadrado) como medida de cuantificación de la heterogeneidad, definiéndose esta como baja si el valor de I^2 obtenido era de 25-50%, moderada si el valor de I^2 obtenido era del 51-75% o alta para valores obtenidos de I^2 superiores 75% (Higgins et al., 2003).

Una vez detectada la presencia de heterogeneidad, el siguiente paso fue investigar las posibles causas de la misma. Una de las primeras causas de heterogeneidad en los Meta-análisis sobre precisión de tests diagnósticos es el llamado "efecto umbral" ("*threshold effect*"). Existe "efecto umbral" cuando en los distintos estudios incluidos, se han empleado diferentes puntos de corte para definir el resultado del test diagnóstico como positivo (o negativo). Es decir, cuando lo que es considerado como resultado positivo en un estudio, es considerado como negativo en otros. Cuando existe este "efecto umbral", se produce una relación *negativa* entre S y E (o *postiva* entre S y 1-E), es decir, a mayor S menor E y viceversa. Ello se traduce en un patrón típico del espacio sROC ("*summary ROC space*") que adquiere una morfología característica (forma de hombro). Del mismo modo, en los "gráficos de bosque" se observa que los incrementos de S se acompañan de disminuciones de la E y viceversa, de ahí que la inspección visual de los gráficos constituya el primer escalón en el estudio de heterogeneidad en un Meta-análisis (Glas et al., 2003).

Pero al margen del "efecto umbral", existen otras posibles causas de heterogeneidad que pueden conducir de igual modo a variaciones en las estimaciones de precisión. Así, además del puro azar cuestiones metodológicas relacionadas con la población de estudio, el diseño de los trabajos o los tipos de test empleados, pueden ser también causa de heterogeneidad. Por ello, para explorar todas estas cuestiones y detectar la presencia de otras posibles causas de heterogeneidad, se emplearon técnicas de meta-regresión incluyendo diversas covariables en el análisis.

La meta-regresión es una herramienta estadística que permite valorar si alguna característica subyacente de los estudios puede estar afectando a la heterogeneidad de los resultados. Es decir, en este tipo de análisis, determinadas características de los estudios se usan como variables explicativas en un modelo de regresión multivariante, en el que la variable dependiente es el efecto medido (en nuestro caso la precisión diagnóstica del test problema) o alguna medida de la desviación del efecto de cada estudio respecto del efecto global. La unidad de observación es cada estudio o cada subgrupo de estudios, y para estimar los coeficientes de la ecuación de regresión se emplean métodos que ponderan cada estudio de acuerdo a su precisión (proporcional al tamaño del estudio, inversamente proporcional a la variabilidad del estudio). Del mismo modo que en el análisis de regresión tradicional, se recomienda ajustar el número de covariables introducidas en el modelo, de modo que no se aconseja una ratio superior a 1 por cada 5 o 10 estudios.

Por último se realizó un análisis por subgrupos persiguiendo siempre la máxima homogeneidad posible en los mismos. En cualquier caso, todo análisis agrupado se efectuó siempre empleando el método de "efectos aleatorios", en el que la inferencia se basa en suponer que los estudios incluidos en el análisis constituyen una muestra aleatoria del universo de estudios posibles. Los resultados obtenidos mediante este método son más conservadores que los obtenidos con otros alternativos, debido a que tiene en cuenta tanto la variación existente dentro de los estudios como la variación existente entre los estudios. Es decir, el método de "efectos aleatorios" asume que además existir un error aleatorio, las diferencias halladas entre los estudios pueden deberse a diferencias reales entre las poblaciones estudiadas o entre los procedimientos seguidos. Se empleó el estadístico z para comparar la S y E entre los subgrupos (Deville et al., 2002).

La última parte del análisis consistió en la valoración de la posible existencia de sesgo de publicación. Este tipo de sesgo es causa de una de las principales críticas que ha recibido clásicamente el Meta-análisis. El sesgo de publicación hace referencia al hecho de que no todos los estudios tienen la misma probabilidad de ser publicados. En realidad, los estudios multicéntricos con financiación externa y que encuentran resultados estadísticamente significativos, se publican con mayor facilidad, mientras que los editores y revisores de las revistas deciden en ocasiones no aceptar algunos estudios en función de determinadas características, relacionadas más con los resultados encontrados que con la calidad (Argimon Pallás y Jiménez Villa, 2004).

Además, los trabajos con resultados estadísticamente significativos tardan menos en ser publicados, tienen una mayor probabilidad de aparecer en las revistas con mayor factor de

impacto y son citados con más frecuencia, lo que aumenta considerablemente la probabilidad de que aparezcan en una búsqueda bibliográfica. Así mismo, los ensayos con gran número de pacientes, tienen mayor probabilidad de ser publicados.

Por otro lado, debe recordarse, que los estudios realizados sobre cohortes pequeñas estiman con menor exactitud la precisión diagnóstica del test, y presentan mayor variabilidad en sus resultados. Por el contrario los estudios realizados a partir de cohortes de mayor tamaño muestran menor variabilidad (Argimon Pallás y Jiménez Villa, 2004).

Todos estos aspectos son considerados cuando se investiga en una Revisión Sistemática la presencia o no de sesgo de publicación.

En esta tesis, la valoración del sesgo de publicación se realizó mediante la construcción de un "gráfico en embudo" ("*funnel plot*") también llamado "gráfico de árbol", construido a partir del logaritmo neperiano de la odds ratio diagnóstica (ln dOR) en el eje de abscisas (x), y el error estándar en el eje de ordenadas (y), lo que es en opinión de los expertos la mejor opción de las posibles para construir dicho gráfico (Sterne y Egger, 2001).

En ausencia de sesgo de publicación, el gráfico adquiere forma de embudo simétrico porque los resultados de los estudios de menor tamaño se distribuyen de manera dispersa por la base del gráfico, disminuyendo gradualmente la dispersión a medida que aumenta la precisión en los estudios de mayor tamaño. Si existe sesgo de publicación el gráfico adquiere una apariencia asimétrica.

Además del sesgo de publicación, el "gráfico de embudo" permite identificar los estudios con un comportamiento extraño ("*outliers"*), y de este modo, permite realizar una revisión cuidadosa de éstos y eventualmente una exclusión de los mismos para el análisis.

La prevención del sesgo de publicación es importante desde el punto de vista puramente científico, ya que, si la toma de decisiones en la práctica clínica diaria se ha de basar en los datos publicados, la literatura debe incluir todos los estudios que tengan una calidad aceptable. Pero además, la prevención del sesgo de publicación resulta imprescindible desde la perspectiva de los autores que realizan una Revisión Sistemática, ya que, si se publican preferentemente artículos con resultados positivos, cualquier Revisión Sistemática tenderá a obtener también resultados positivos.

Debido a que la interpretación de la apariencia y simetría del "gráfico de embudo" no deja de ser algo subjetivo, se empleó también el test de regresión de Egger para cuantificar de manera objetiva y dotar de un valor numérico la asimetría del gráfico, de modo que a mayor desviación del cero del valor "*intercept*", mayor se considera la asimetría del gráfico (Egger et al., 1997).

Todo el análisis estadístico se efectuó con el programa Meta-Disc (http://www.hrc.es/investigacion/metadisc_en.htm), disponible en la web de manera gratuita (Zamora et al., 2006). El análisis del sesgo de publicación de realizó con el programa estadístico CMA-1 (http://www.Meta-Analysis.com) y a un nivel de significación de P=0.05.

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADO DE LA BÚSQUEDA DE EVIDENCIAS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS

La estrategia de búsqueda automatizada inicial condujo a la pre-selección de 812 artículos, de los cuales 254 se consideraron tributarios revisión a texto completo. De ellos, 182 estudios fueron excluidos por diversas razones por lo que fueron finalmente 72 trabajos los seleccionados para la extracción de datos. Todos los estudios seleccionados fueron estudios de cohorte.

De estos, 17 estudios (Brock et al., 2003; Furonaka et al., 2005; Jeuken et al., 2007; Karayan-Tapon et al., 2010; Lin et al., 2005; Martin et al., 2008; Matsukura et al., 2003; Mellai et al., 2009; Nagasaka et al., 2003; Preusser et al., 2008; Rietschel et al., 2008; Rood et al., 2004; Voelter et al., 2008; Yachi et al., 2008; Yang et al., 2009; Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2003) no reportaban la información necesaria para la construcción de la tabla de contingencia de 2x2, y en otros tres (Herfarth et al., 1999; Lazcoz et al., 2007; Yin et al., 2003) la expresión proteica de MGMT era valorada mediante otras técnicas de laboratorio distintas a la IHQ. Por estas razones estos 20 estudios fueron también excluidos del análisis.

Finalmente fueron por lo tanto 52 estudios los que constituyeron la base de nuestro análisis: 17 de estos eran estudios de gliomas, 3 eran estudios de tumores cerebrales no gliales y 32 de tumores sistémicos no cerebrales (Figura II.1.).

La suma de casos de los 52 estudios incluidos supone un total de 2,943 pacientes: 539 con diagnóstico de tumor cerebral primario, 178 con metástasis cerebrales de tumores primarios diversos, y 2,226 diagnosticados de tumores no cerebrales.

En las Tablas II.4. y II.5. se exponen las principales características de los estudios incluidos.

Figura II.1.: Búsqueda de evidencia y selección de artículos

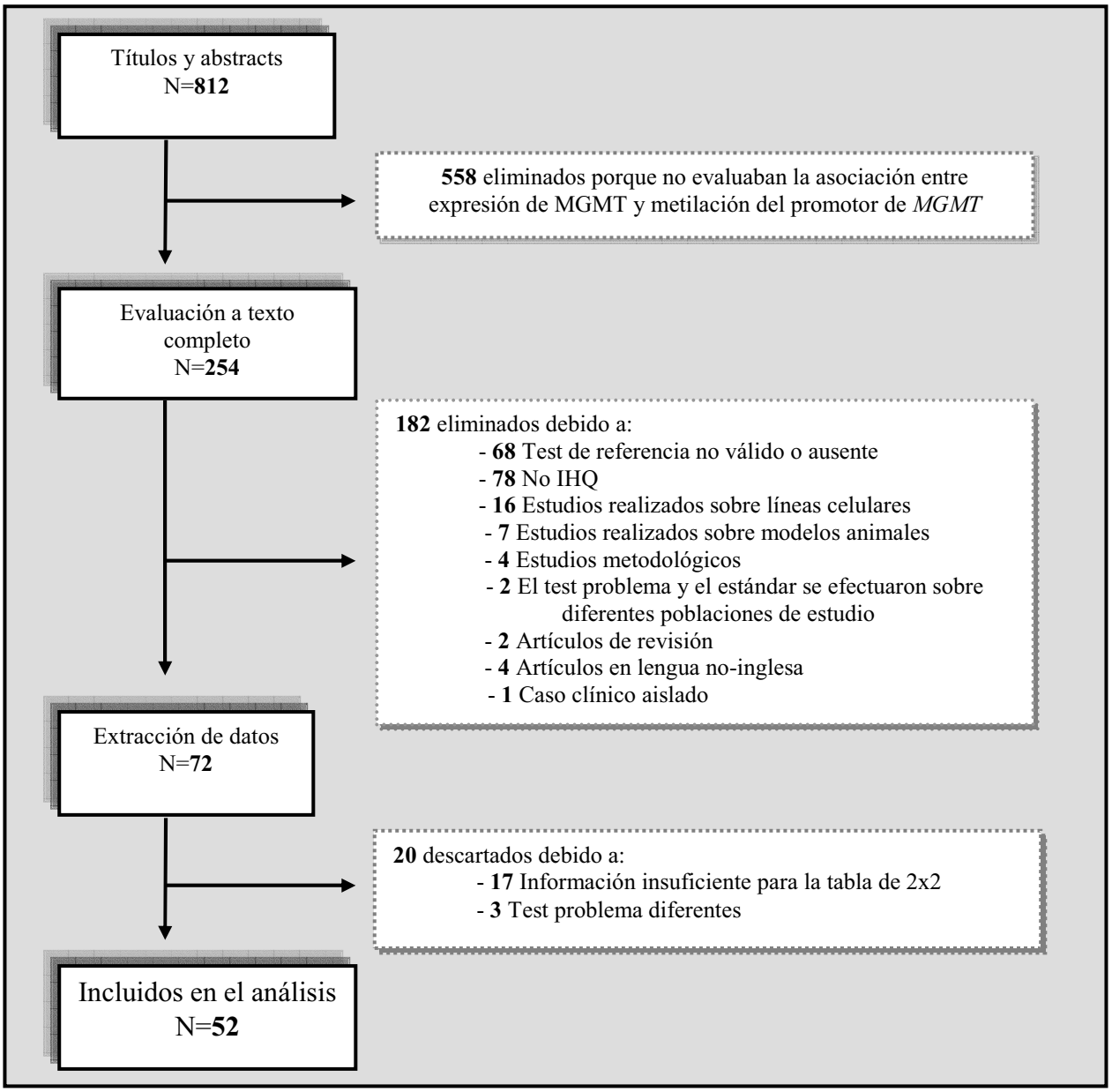


Tabla II.4.: Características de los estudios seleccionados para revisión a texto completo correspondientes a series de gliomas

Autor / año	n / histología	Test de referencia (% de resultados informativos)	Porcentaje de casos metilados	Anticuerpo para la IHQ	Asociación e.s entre los test?	Valor del punto de corte para la IHQ	Análisis histológico [1]	Impacto pronóstico del promotor metilado o de la ausencia de proteína		Factor independiente en el análisis multivariante.	Incluído en el análisis
								SLP	SG		
Karayan-Tapon et al., 2010	81 GB	MSP	68%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (Novus Biologicals)	si	15%	si	no	no	no	no
Nakagawa et al., 2009	11 GB	MSP	54.5%	Ac. monoclonal MAB16200 (Chemicon)	si	≥5%	si	-- [2]	si	si	si
Sonoda et al., 2009	18 GB	MSP	25-79% [3]	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (Chemicon)	si	≥10%	n.d.	si	si	si	si
Metellus et al., 2009	21 GB	MSP	28.6%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (Chemicon)	si	≥10%	n.d.	si	si	si	si
Cao et al., 2009	73 GB	MSP	60.5%	Ac. Monoclonal de ratón clon MT 3.1 (Abcam, Camb.)	no	≥5%	n.d.	si	si	si	si
Kuo et al., 2009	36 GBG	MSP	53.1%	Ac.	no	≥10%	n.d.	no	no	si	si

	13 GA			monoclonal de ratón clon MT 3.1 (LabVision Corporation							
Felsberg et al., 2009	57 GB	MSP	39%	Ac. monoclonal clon MT 3.1 (Dako)	no	≥10%	si	si	si	si	si
Yang et al., 2009	36 GA	MSP	88.9%	Ac. monoclonal clon MT 3.1 (NeoMarkers)	si	≥5%	n.d.	--	--	--	no
Mellai et al., 2009	96 GB	MSP (97.1%)	28.7%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (Chemicon)	no	>50%	si	--	no	no	no
Preusser et al., 2008	164 GB	MSP	48.8%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (Dako) Ac. monoclonal clon MT23.2 (Zymed)	no (correlación pobre-moderada)	neg vs. pos, 10%, 50%	n.d.	--	si	--	no
Yachi et al., 2008	25 GB	MSP	32%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (Chemicon)	no	5%, 10%, 20%, 30%, 35%	si	no	no	--	no
Sasai et al., 2008	15 GB 5 GA 1 GBG	MSP (85%)	61%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (Chemicon)	no	Cualitativo	n.d.	--	--	--	si
Buccoliero et	12 EA	MSP (75%)	0%	Ac.	si	≥10%	si	--	--	--	si

al., 2008				monoclonal de ratón clon MT 3.1 (NeoMarkers)							
Parkinson et al., 2008	10 GB	MSP (90.9%) Secuenciación	30%	Ac. monoclonal clon MT23.2 (Affinity Bioreagents)	si	≥10%	si	--	--	--	si
Rodríguez et al., 2008	50 GB	MSP (78%)	38.5%	Ac. monoclonal clon MT 3.1 (NeoMarkers)	no	≥10%	n.d.	--	no	--	si
Jeuken et al., 2007	33 gliomas	MSP	21%	Ac. monoclonal clon MT 3.1 (Chemicon)	no	Cualitativo	n.d.	--	no	--	no
Grasbon-Frodl et al., 2007	18 GB 7 AA	MSP (100%) Secuenciación	30-80%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (Dako)	no	≥10%	si	--	--	--	si
Lavon et al., 2007	10 O 4 OA 7 OAnapl. 2 OAA	MSP	19-68%	Ac. monoclonal MAB16200 (Chemicon)	no	≥10%	n.d.	--	--	--	si
Cankovic et al., 2007	80 GB 43 GA 40 GBG	MSP (98%)	44%	Ac. monoclonal de ratón clon MT23.2 (Invitrogen)	si	≥5%	si	--	--	--	si
Maxwell et al., 2006	22 GB 10 GA	MSP modificada (96.8%)	61%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1	no	≥20%	si	--	--	--	si
Brell et al.,	40 GA	MSP (45%)	50%	Ac.	no	≥5%	si	no	si	si	si

2005				monoclonal de ratón clon MT 3.1 (NeoMarkers)							
Möllemann et al., 2005	9 O 23 OA 9 O Anapl. 11 OAA	MSP (100%)	88%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (NeoMarkers)	no	≥10%	si	--	--	--	si
Rood et al., 2004	32 Medulobl astoma	MSP (100%)	76%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (NeoMarkers)	no	Cualitativo	n.d.	--	--	--	no
Esteller et al., 1999	8 gliomas	MSP	38%	Ac. Monoclonal de ratón AB (N99200, Novus Molecular Inc., San Diego)	si	Cualitativo	n.d.	--	--	--	si

AA: Astrocitoma anaplásico; Ac.: Anticuerpo; EA: Ependimoma anaplásico; GA: Glioma Anaplásico; GB: Glioblastoma; GBG: Glioma de bajo grado; e.s.: estadísticamente significativo; n.d.: Información no disponible; O: Oligodendroglioma; OA: Oligoastrocitoma; OAA: Oligoastrocitoma anaplásico; OAnapl: Oligodendroglioma anaplásico; SLP: Supervivencia libre de progresión; SG: Supervivencia global 1: Análisis histológico del tejido empleado para la extracción del ADN; 2: No realizado; 3: 79% para largos supervivientes y 25% para cortos supervivientes; -- No evaluado

Tabla II.5.: Características de los estudios seleccionados para revisión a texto completo correspondientes a series de tumores cerebrales no-gliales y tumores sistémicos

Author / año	n / histologia	Test de referencia (% de resultados informativos)	Porcentaje de casos metilados	Anticuerpo para la IHQ	Asociación e.s entre los test?	Valor del punto de corte para la IHQ	Análisis histológico [1]	Impacto pronóstico del promotor metilado o de la ausencia de proteína		Factor independiente en el análisis multivariante.
								SLP	SG	
Tumores cerebrales no-gliales										
McCormack et al., 2009	46 Tumores hipofisarios	MSP (72%)	9%	Ac. monoclonal de ratón clon MT23.2 (Affinity Bioreagents)	si	≥10%	si	--	--	--
Ingold et al., 2009	178 Metastasis cerebrales	Nested MSP (61.2%)	29.6%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (NeoMarkers)	si	≥5%	n.d.	--	--	--
Chu et al., 2006	11 LPSNC	Nested MSP	52%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Lab Vision Corporation)	si	>80%	si	--	--	--

Tumores sistémicos										
Kim et al., 2009	62 Sarcomas de partes blandas	MSP (100%)	33.9%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 3.1 (NeoMarkers)	si	≥10%	n.d.	si	si	si
Uccella et al., 2009	50 Linfomas B	MSP	20%	Ac. Monoclonal de ratón clon MT 3.1 (NeoMarkers)	si	≥5%	n.d.	si	si	--
Lee et al., 2009	53 Linfomas B	MSP	45.2%	MT 5.1 ; BD Biosciences, Pharmingen, USA	si	n.d.	n.d.	no	no	no
Wu et al., 2010	85 Ca. pulmonar y metástasis	Nested MSP	4-11%	Ac. Monoclonal de ratón clon MT3.1 (Lab Vision)	si	≥10%	n.d.	si	si	si
Zou et al., 2009	57 «*Early gastric cancer*»	MSP	48.1-50%	Ac. monoclonal de ratón Zhongshan Biotech, China	si	≥5%	n.d.	--	--	--
Rimel et al., 2009	141 Ca. endometrial y ovárico	COBRA	0%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Dako)	si	Cualitativa	n.d.	--	--	--
Kuester et al., 2009	47 Adenoca. de Barret	MSP	78.9%	Ac. monoclonal de ratón clon MT 23.2 (Zymed)	si	Escala de inmunorreactividad	si	--	--	--
Nagasaka et al., 2008	85 Ca. colorrectal 29	COBRA y secuenciación	36%	Ac. monoclonal de	si	Cualitativa	n.d.	--	--	--

	Pólipos adenomatosos			ratón clon MT3.1 (PharMingen)						
Herath et al., 2007	36 Ca. hepático	MSP	0%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (NeoMarkers)	no	Cualitativa	n.d.	--	--	--
Mikami et al., 2007	153 Tumores asociados a colitis ulcerosa	MSP	30-33%	Ac. Monoclonal de ratón clon MT3.1 (NeoMarkers)	si	Cualitativa	si	--	--	--
Ogawa et al., 2006	34 Ca. colorectal	MSP	58.8%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (NeoMarkers)	si	≥10%	si	--	--	--
Baumann et al., 2006	101 Adenoca. esófago	RT-MSP	63.6%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Lab-Vision)	si	≥5%	si	--	no	--
Kawaguchi et al., 2006	50 Sarcomas de partes blandas	MSP	15%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Santa Cruz Biotechnology)	si	≥10%	si	--	--	--
Martin et al., 2006	20 Gammapatías monoclonales	MSP (100%)	23%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Dako)	si	>30%	n.d.	--	--	--
Fox et al., 2006	110 Ca. colorectal	MSP (100%)	43%	Ac. monoclonal de ratón clon	si	Cualitativa	n.d	--	--	--

				MT3.1 (NeoMarkers)						
Munot et al., 2006	18 Ca. mama	MSP	38.8%	MGMT Pharmigen, Ox, UK	si	Escala de inmunorreactividad	si	--	--	--
Shen et al., 2005	24 Ca. colorectal	MSP	46%	Ac. monoclonal de ratón MAB16200 (Chemicon)	si	Cualitativa	n.d.	--	--	--
Koga et al., 2005	37 Ca. biliar	MSP (método de "dos pasos")	49%	Ac. Polyclonal de conejo clon G168-728; (PharMingen, San Diego, CA)	si	≥10%	si	--	si	--
Qi et al., 2005	89 Tumores colorectales	MSP	40.7-43.5%	Ac. Monoclonal de ratón	si	≥10%	n.d.	--	--	--
Kohonen-Corish et al., 2005	176 Ca. colon	MSP (98.9%)	53%	Clon MT5.1, BD Pharmigen 557045	si	Cualitativa	si	--	no	--
Rossi et al., 2004	28 Linfomas B	MSP	23.8-27.6%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Chemicon)	si	Cualitativa	n.d.	--	--	--
Kang et al., 2004	14 Ca. próstata	MSP	75.7%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Chemicon) Temecula, CA)	si	Cualitativa	n.d.	--	--	--
Zhang et al., 2003a	83 Ca. hepato-celular	MSP	39%	Ac. monoclonal clon MT3.1	si	Cualitativa	n.d.	--	--	--

				(NeoMarkers)						
Kim et al., 2003	169 Adenomas y ca. colorectales	MSP	51.4%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Chemicon)	si	≥10%	n.d	--	--	--
Bae et al., 2002	149 Ca. gástrico	MSP	14.1%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Chemicon)	si	Cualitativa	n.d.	--	si	no
Choy et al., 2002	23 Retino-blastomas	MSP	34.7%	Ac. 3B8, Inst. Mol.Cell. Biology, Nat.Univ. of Singapore	si	≥10%	n.d.	--	--	--
Esteller et al., 2002	26 Linfomas B	MSP	36%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Chemicon)	si	Cualitativa	n.d.	si	si	si
Hayashi et al., 2002	87 Adenoca. pulmonar	MSP	35.6%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (Chemicon)	si	Escala de inmunorreactividad	n.d.	--	si	--
Smith-Sørensen et al., 2002	20 Ca. testicular	MSP	46%	Ac. Policlonal de cabra sc-8825 (Santa Cruz Biotechnoloy)	no	≥5%	si	--	--	--
Park et al., 2001	71 Ca. gástrico	MSP	23%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (NeoMarkers)	no	≥5%	si	si	--	no

Wolf et al., 2001	19 Ca. pulmón no célula pequeña	MSP	29%	Ac. monoclonal de ratón clon MT3.1 (NeoMarkers)	si	Cualitativa	si	--	--	--
Whitehall et al., 2001	80 Ca. colorectal	MSP	38.7%	Ac. Monoclonal de ratón clon MT3.1 (NeoMarkers)	si	Cualitativa	n.d.	--	--	--

e.s.: estadísticamente significativo; Ac.: Anticuerpo; n.d.: No disponible; -- No evaluado; SLP: Supervivencia libre de progresión; SG: Supervivencia global; 1: Análisis histológico del tejido empleado para la extracción del ADN

En lo referente al análisis inmunohistoquímico, el anticuerpo comercial más comúnmente empleado fue el anticuerpo monoclonal de ratón clon MT3.1 de distintas casas comerciales (Dako, Chemicon International, NeoMarkers, Santa Cruz Biotechnology o laboratorios Kamiya Biomedical), empleado en 39 (75%) de los 52 estudios, seguido del anticuerpo monoclonal de ratón clon MT23.2 de laboratorios Zymed, que fue empleado en 4 (7.6%) de las series analizadas. Se emplearon otros anticuerpos diferentes a los anteriormente expuestos en 7 (13.4%) series. En uno de los estudios (Qi et al., 2005) los autores no explicitan el tipo o marca comercial de anticuerpo empleado.

La valoración de la inmunoexpresión se realizó de manera cualitativa en 16 (30.8%) de las 52 series analizadas. Por consiguiente, en los 36 estudios restantes (69.2% de las series analizadas), los autores emplearon algún tipo de escala de valoración semicuantitativa, realizando una estimación de la fracción de células positivas en el tumor. En la mayoría de las series de tumores cerebrales (en 18 de las 20 series) la valoración de la expresión inmunohistoquímica se efectuó de manera semicuantitativa, mientras que en las series de tumores sistémicos sólo se efectuó un análisis inmunohistoquímico semicuantitativo en 18 de las 32 series evaluadas.

Como puede apreciarse en las Tablas II.4. y II.5. los puntos de corte o umbrales de positividad seleccionados por los distintos autores fueron ostensiblemente diferentes, oscilando entre el 5% y el 80% de celularidad positiva en el tumor. Es decir, la fracción de células positivas en la muestra necesarias para considerar el tumor como positivo para la inmunoexpresión de MGMT no es la misma en todos los casos, lo que tendrá gran relevancia en el análisis de los resultados, como posteriormente se expondrá.

Para el análisis de metilación del promotor de *MGMT* mediante MSP, se requiere de la obtención y procesamiento del ADN tumoral, tal como se ha detallado en el apartado de material y métodos. La obtención de este ADN genómico se efectuó a partir de muestras de tejido parafinado en 26 estudios (50%), mientras que en 21 de las series (40.3%) se aisló a partir de muestras de tejido congelado. En 5 casos (9.6%), los autores expresaron haber empleado ambos tipos de muestras en función de la disponibilidad de las mismas.

Del mismo modo, el tratamiento con bisulfito del ADN tumoral puede realizarse del modo tradicional o con la ayuda de kits de metilación comerciales disponibles en la actualidad. En 24 de los 52 estudios analizados se empleó un kit comercial para el tratamiento con bisulfito del ADN tumoral. De entre todos ellos, los más comúnmente empleados fueron el "*DNA Methylation Kit (Zymo Research)",* el *"Methylamp DNA Modification Kit (Epigentek Inc)",* el *"CpGenome DNA Modification Kit (Intergen)",* y el "*Fast DNA Modification Kit (Chemicon)".*

El análisis de la concordancia entre los resultados de la IHQ y de la MSP demostraron una buena concordancia entre los resultados de ambas técnicas en 9 de los 20 (45%) estudios correspondientes a series de tumores cerebrales, mientras que en el grupo de estudios realizados sobre tumores sistémicos se halló una buena correlación entre ambas técnicas en 29 de las 32 series evaluadas (90.6%).

5.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS

Los resultados de la evaluación de la calidad metodológica de los trabajos incluidos según la escala QUADAS se resumen en la Tabla II.6. y Figura II.2.

Tabla II.6.: Evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos según la escala QUADAS

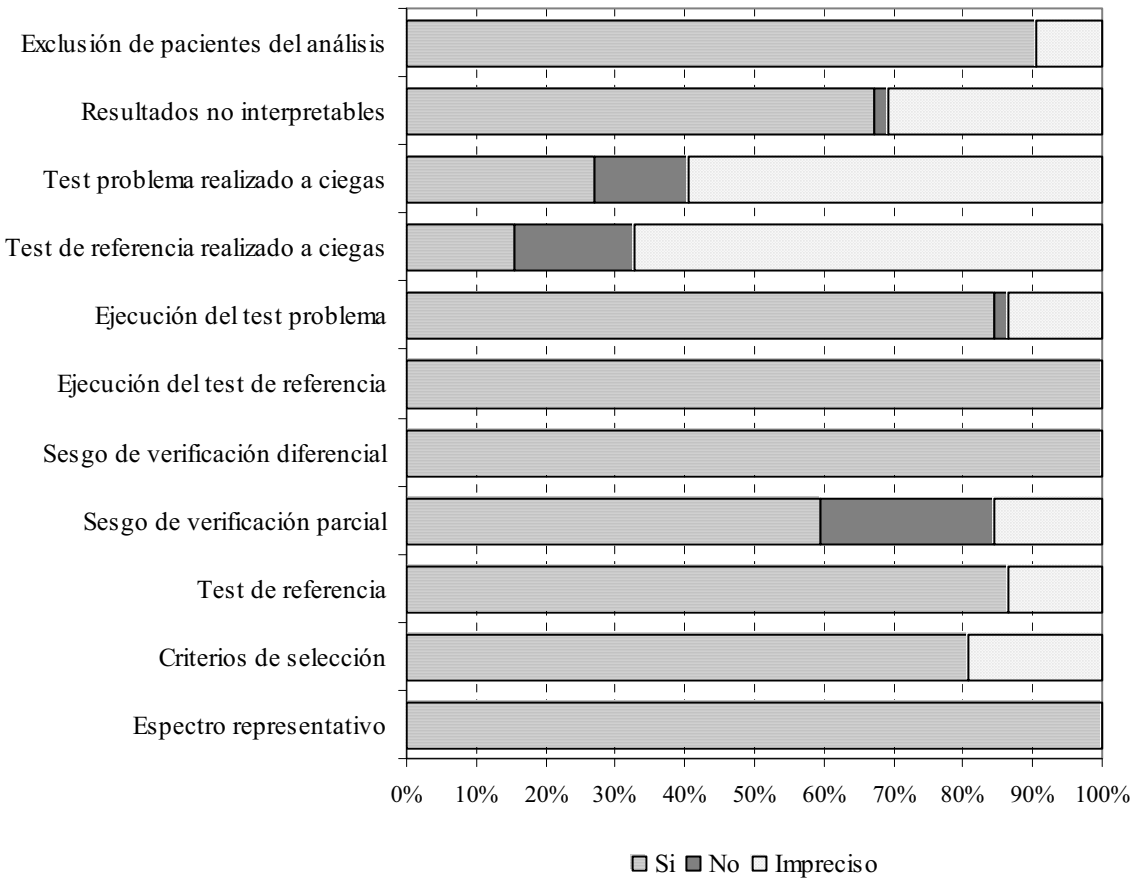
	Espectro representativo	Criterios de selección	Test de referencia	Sesgo de verificación parcial	Sesgo de selcción	Ejecución del test de referencia	Ejecución del test problema	Test de referencia a ciegas	Test problema a ciegas	Resultados no interpretables	Eliminación de de casos del análisis
Wu et al., 2010	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	No	No	Incierto	Incierto
Uccella et al., 2009	Si	Si	Si	Incierto	Si	Si	Incierto	No	No	Incierto	Incierto
Zou et al., 2009	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Sonoda et al., 2009	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto

Lee et al., 2009	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	No	Incierto	Incierto
Metellus et al., 2009	Si	Si	Si	Incierto	Si	Si	Si	No	No	Incierto	Incierto
Cao et al., 2009	Si	Incierto	Si	Incierto	Si	Si	Si	No	No	Si	Si
Kuo et al., 2009	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	No	No	Si	Si
Felsberg et al., 2009	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Ingold et al., 2009	Si	Si	Incierto	No	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Kim et al., 2009	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Rimel et al., 2009	Si	Incierto	Incierto	Incierto	Si	Si	Incierto	Incierto	Incierto	Incierto	Si
Nakagawa et al., 2009	Si	Si	Si	Incierto	Si	Si	Si	Incierto	Si	Si	Si
Kuester et al., 2009	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
McCormack et al., 2009	Si	Si	Incierto	No	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si
Buccoliero et al., 2008	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Nagasaka et al., 2008	Si	Si	Incierto	No	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Incierto	Si
Parkinson et al., 2008	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Rodríguez et al., 2008	Si	Incierto	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Si	Si	Si
Sasai et al., 2008	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Cankovic et al., 2007	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Grasbon-Frodl et al., 2007	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Si	Si	Si
Herath et al., 2007	Si	Incierto	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Incierto	Si
Lavon et al., 2007	Si	Incierto	Si	No	Si	Si	Si	Incierto	Si	Incierto	Si
Mikami et al., 2007	Si	Incierto	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Baumann et al., 2006	Si	Si	Incierto	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Chu et al., 2006	Si	Si	Incierto	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Incierto	Si	Si
Fox et al., 2006	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Kawaguchi et al., 2006	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Martin et al., 2006	Si	Incierto	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Incierto	Si
Maxwell et al., 2006	Si	Si	Incierto	No	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Munot et al., 2006	Si	Si	Si	No	Si	Si	Incierto	No	Si	Si	Si
Ogawa et al., 2006	Si	Si	Si	Incierto	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Incierto	Si
Brell et al., 2005	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Kohonen-Corish et al., 2005	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Koga et al., 2005	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Möllemann et al., 2005	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Shen et al., 2005	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Qi et al., 2005	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Kang et al., 2004	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Rossi et al., 2004	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si
Kim et al., 2003	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	No	Incierto	Incierto	Si
Zhang et al., 2003	Si	Si	Incierto	Si	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si
Bae et al., 2002	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Incierto	Si	Si
Choy et al., 2002	Si	Incierto	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Incierto	Si
Esteller et al., 2002	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Si	Si	Si
Hayashi et al., 2002	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Smith-Sorensen et	Si	Incierto	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si

al., 2002											
Park et al., 2001	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	Si	Si
Whitehall et al., 2001	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Incierto	Incierto	No	Si
Wolf et al., 2001	Si	Si	Si	Incierto	Si	Si	Incierto	Incierto	Incierto	Incierto	Si
Esteller et al., 1999	Si	Incierto	Si	Incierto	Si	Si	Si	Incierto	Si	Incierto	Si

Figura II.2.: Evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos según la escala QUADAS



Como puede observarse en la Figura II.2. la inclusión de un espectro representativo de pacientes y la exposición adecuada por parte de los autores de los criterios de selección de la población de estudio, resultaron la norma en la totalidad de los trabajos incluidos en el análisis.

En cuanto a las técnicas diagnósticas, en 8 de los estudios (Baumann et al., 2006; Chu et al., 2006; Ingold et al., 2009; Maxwell et al., 2006; McCormack et al., 2009; Nagasaka et al., 2008; Rimel et al., 2009; Uccella et al., 2009) los autores expresaron haber realizado alguna modificación de la MSP original, detallándola en el correspondiente apartado de metodología.

En aproximadamente una cuarta parte de los estudios incluidos no se evitó la posibilidad de "sesgo de verificación parcial" (también llamado "sesgo de confirmación"), debido a que no se obtuvo confirmación diagnostica con el test estándar de referencia de todos los casos estudiados mediante el test problema. Así, algunos autores expresaron por ejemplo en sus respectivas series, que sólo aquellas muestras con un porcentaje estimado de celularidad tumoral igual o superior al 80% fueron sometidas al test molecular de referencia (MSP) (Möllemann et al., 2005).

Dado que el presente análisis incluye estudios en los que se ha comparado sobre la misma cohorte de casos la expresión inmunohistoquímica de la proteína MGMT con el estado de metilación del promotor de *MGMT* determinado mediante PCR específica de metilación (MSP), la posibilidad del llamado "sesgo de verificación diferencial" es despreciable. Dicho de otro modo, en todos los estudios incluidos, la verificación de los resultados de la IHQ se realizó mediante MSP para toda la cohorte de muestras.

Como puede apreciarse en la Figura II.2. son escasos los estudios en los que se explicite claramente que la interpretación del test de referencia se haya efectuado sin conocimiento previo de los resultados del test problema y viceversa, es decir, que la valoración de la expresión inmunohistoquímica se haya llevado a cabo "a ciegas" de los resultados de la MSP. De hecho, hasta en el 84.6% de las series incluidas en el análisis los autores no especifican que la interpretación de la MSP se realizara a ciegas de los resultados del análisis inmunohistoquímico, y en el 73% de los mismos no se detalla lo propio en relación a la valoración a ciegas de la IHQ.

En 17 de los 52 estudios analizados, no se especifican detalles en relación a posibles resultados no-interpretables o imprecisos de los tests diagnósticos (Choy et al., 2002; Esteller et al., 1999; Herath et al., 2007; Kim et al., 2003; Lavon et al., 2007; Lee et al., 2009; Martin et al., 2006; Metellus et al., 2009; Nagasaka et al., 2008; Ogawa et al., 2006; Rimel et al., 2009; Rossi et al., 2004; Sonoda et al., 2009; Uccella et al., 2009; Whitehall et al., 2001; Wolf et al., 2001; Wu et al., 2010).

La expresión inmunohistoquímica fue evaluada de manera semicuantitativa o cualitativa por los distintos grupos siendo convenientemente descrito en el apartado de metodología de los mismos, y sólo en 6 de los estudios incluidos en el análisis (Bae et al., 2002; Chu et al., 2006; Lee et al., 2009; Munot et al., 2006; Rimel et al., 2009; Wolf et al., 2001) los autores no exponen con claridad la forma en la que se efectuó la interpretación de dicho test.

5.3 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los resultados de Sensibilidad (S), Especificidad (E), Razón de verosimilitud o Likelihood ratio (LR) y la Razón de probabilidad diagnóstica u Odds ratio diagnóstica (ORd) para todos los estudios se detallan en la Tabla II.7.

Tabla II.7.: Sensibilidad, Especificidad, Likelihood Ratios y Odds Ratio diagnósticas de cada uno de los estudios

Study	VP	FP	FN	VN	S	IC 95%	E	IC 95%	LR-	IC 95%	LR+	IC 95%	ORd	IC 95%
Rimel et al., 2009	0	0	1	140	0.250	0.000 - 0.939	0.996	0.967 - 1.000	0.753	0.338 - 1.675	70.50	1.80 - 2748.1	93.667	1.353 - 6483.3
Felsberg et al., 2009	19	21	5	12	0.722	0.578 - 0.929	0.634	0.204 - 0.549	0.576	0.233 - 1.411	1.244	0.895 - 1.730	2.171	0.645 - 7.310
Kim et al., 2009	14	6	7	35	0.667	0.430 - 0.854	0.854	0.708 - 0.944	0.390	0.210 - 0.724	4.556	2.049 - 10.12	11.667	3.328 - 40.895
Kuo et al., 2009	11	9	15	14	0.423	0.234 - 0.631	0.609	0.285 - 0.803	0.948	0.596 - 1.508	1.081	0.548 - 2.132	1.141	0.364 - 3.578
Lee et al., 2009	16	4	8	25	0.667	0.447 - 0.844	0.862	0.683 - 0.961	0.387	0.216 - 0.694	4.833	1.864 - 12.53	12.500	3.226 - 48.429
Cao et al., 2009	31	13	13	16	0.705	0.548 - 0.832	0.552	0.357 - 0.736	0.536	0.305 - 0.939	1.572	1.005 - 2.457	2.935	1.105 - 7.798
Metellus et al., 2009	6	2	0	13	1.000	0.541 - 1.000	0.687	0.595 - 0.983	0.085	0.006 - 1.234	5.943	1.869 - 18.90	70.200	2.927 - 1683.5
Sonoda et al.,,2009	8	1	2	7	0.800	0.444 - 0.975	0.875	0.473 - 0.997	0.229	0.064 - 0.811	6.400	0.997 - 41.08	28.000	2.067 - 379.25
Nakagawa et al., 2009	5	0	1	5	0.833	0.359 - 0.996	1.000	0.478 - 1.000	0.234	0.055 - 0.986	9.429	0.645 - 37.77	40.333	1.330 - 1223.0
Ingold et al., 2009	26	35	22	95	0.542	0.392 - 0.686	0.731	0.646 - 0.805	0.627	0.453 - 0.868	2.012	1.370 - 2.956	3.208	1.613 - 6.379
Uccella et al., 2009	8	11	2	29	0.800	0.444 - 0.975	0.725	0.561 - 0.854	0.276	0.079 - 0.967	2.909	1.611 - 5.253	10.545	1.931 - 57.600
Wu et al., 2009	4	0	0	81	1.000	0.398 - 1.000	1.000	0.955 - 1.000	0.101	0.007 - 1.395	147.60	9.16 - 2376.2	1467.0	25.9 - 82799.5
Zou et al., 2009	14	6	8	29	0.636	0.407 - 0.828	0.829	0.664 - 0.934	0.439	0.247 - 0.778	3.712	1.678 - 8.211	8.458	2.458 - 29.107
Sasai et al., 2008	5	2	6	5	0.455	0.167 - 0.766	0.714	0.290 - 0.963	0.764	0.374 - 1.560	1.591	0.417 - 6.065	2.083	0.275 - 15.772
Buccoliero et al., 2008	0	0	0	12	0.500	0.000 - 1.000	0.962	0.693 - 1.000	0.520	0.073 - 3.703	13.00	0.456 - 370.8	25.000	0.199 - 3139.1
Kuester et al., 2008	7	0	30	10	0.189	0.080 - 0.352	1.000	0.692 - 1.000	0.841	0.686 - 1.031	4.342	0.269 - 70.19	5.164	0.271 - 98.402
Nagasaka et al., 2008	16	8	8	82	0.667	0.447 - 0.844	0.911	0.832 - 0.961	0.366	0.207 - 0.647	7.500	3.653 - 15.39	20.500	6.710 - 62.631
Parkinson et al., 2008	2	1	1	4	0.667	0.094 - 0.992	0.800	0.284 - 0.995	0.417	0.079 - 2.190	3.333	0.485 - 22.89	8.000	0.310 - 206.37

McCormack et al., 2008	3	8	1	34	0.750	0.194 - 0.994	0.810	0.659 - 0.914	0.309	0.056 - 1.697	3.938	1.697 - 9.138	12.750	1.168 - 139.24
Rodriguez et al., 2008	14	18	1	6	0.933	0.681 - 0.998	0.250	0.098 - 0.467	0.267	0.036 - 2.003	1.244	0.952 - 1.626	4.667	0.502 - 43.367
Grasbon-Frodl et al., 2007	4	4	6	9	0.400	0.122 - 0.738	0.692	0.386 - 0.909	0.867	0.465 - 1.615	1.300	0.427 - 3.961	1.500	0.266 - 8.449
Herath et al., 2007	0	4	0	32	0.500	0.000 - 1.000	0.878	0.729 - 0.962	0.569	0.080 - 4.056	4.111	0.482 - 35.03	7.222	0.127 - 411.24
Lavon et al., 2007	3	4	0	5	1.000	0.292 - 1.000	0.556	0.212 - 0.863	0.227	0.016 - 3.226	1.944	0.892 - 4.237	8.556	0.344 - 212.94
Cankovic et al., 2007	8	2	3	9	0.727	0.390 - 0.940	0.818	0.482 - 0.977	0.333	0.122 - 0.910	4.000	1.085 - 14.74	12.000	1.581 - 91.085
Mikami et al., 2007	14	1	17	121	0.452	0.273 - 0.640	0.992	0.955 - 1.000	0.553	0.402 - 0.761	55.09	7.531 - 403.1	99.647	12.30 - 806.70
Baumann et al., 2006	33	4	19	45	0.635	0.490 - 0.764	0.918	0.804 - 0.977	0.398	0.275 - 0.575	7.774	2.972 - 20.33	19.539	6.076 - 62.833
Chu et al., 2006	7	1	0	3	1.000	0.590 - 1.000	0.750	0.194 - 0.994	0.089	0.006 - 1.389	3.125	0.809 - 12.06	35.000	1.119 - 1094.7
Fox et al., 2006	27	10	20	53	0.574	0.422 - 0.717	0.841	0.727 - 0.921	0.506	0.357 - 0.717	3.619	1.948 - 6.724	7.155	2.940 - 17.412
Kawaguchi et al., 2006	7	6	3	34	0.700	0.348 - 0.933	0.850	0.702 - 0.943	0.353	0.136 - 0.918	4.667	2.011 - 10.83	13.222	2.651 - 65.951
Martin et al., 2006	5	7	0	18	1.000	0.478 - 1.000	0.720	0.506 - 0.879	0.117	0.008 - 1.683	3.178	1.659 - 6.088	27.133	1.328 - 554.24
Maxwell et al., 2006	7	1	12	8	0.368	0.163 - 0.616	0.889	0.518 - 0.997	0.711	0.470 - 1.075	3.316	0.477 - 23.06	4.667	0.478 - 45.546
Munot et al., 2006	7	0	0	7	1.000	0.590 - 1.000	1.000	0.590 - 1.000	0.067	0.005 - 0.982	15.00	1.018 - 220.9	225.00	3.92 - 12895.0
Ogawa et al., 2006	16	6	4	8	0.800	0.563 - 0.943	0.571	0.289 - 0.823	0.350	0.130 - 0.939	1.867	0.981 - 3.552	5.333	1.162 - 24.469
Brell et al., 2005	7	4	13	16	0.350	0.154 - 0.592	0.800	0.563 - 0.943	0.813	0.551 - 1.199	1.750	0.606 - 5.054	2.154	0.515 - 9.000
Möllemann et al., 2005	19	3	18	3	0.514	0.344 - 0.681	0.500	0.118 - 0.882	0.973	0.409 - 2.313	1.027	0.435 - 2.426	1.056	0.188 - 5.926
Kohonen-Corish et al., 2005	43	5	51	77	0.457	0.354 - 0.563	0.939	0.863 - 0.980	0.578	0.476 - 0.701	7.502	3.120 - 18.04	12.984	4.818 - 34.992
Koga et al., 2005	16	4	2	15	0.889	0.653 - 0.986	0.789	0.544 - 0.939	0.141	0.037 - 0.531	4.222	1.741 - 10.24	30.000	4.775 - 188.47
Qi et al., 2005	29	5	9	46	0.763	0.598 - 0.886	0.902	0.786 - 0.967	0.263	0.147 - 0.468	7.784	3.323 - 18.23	29.644	9.037 - 97.239

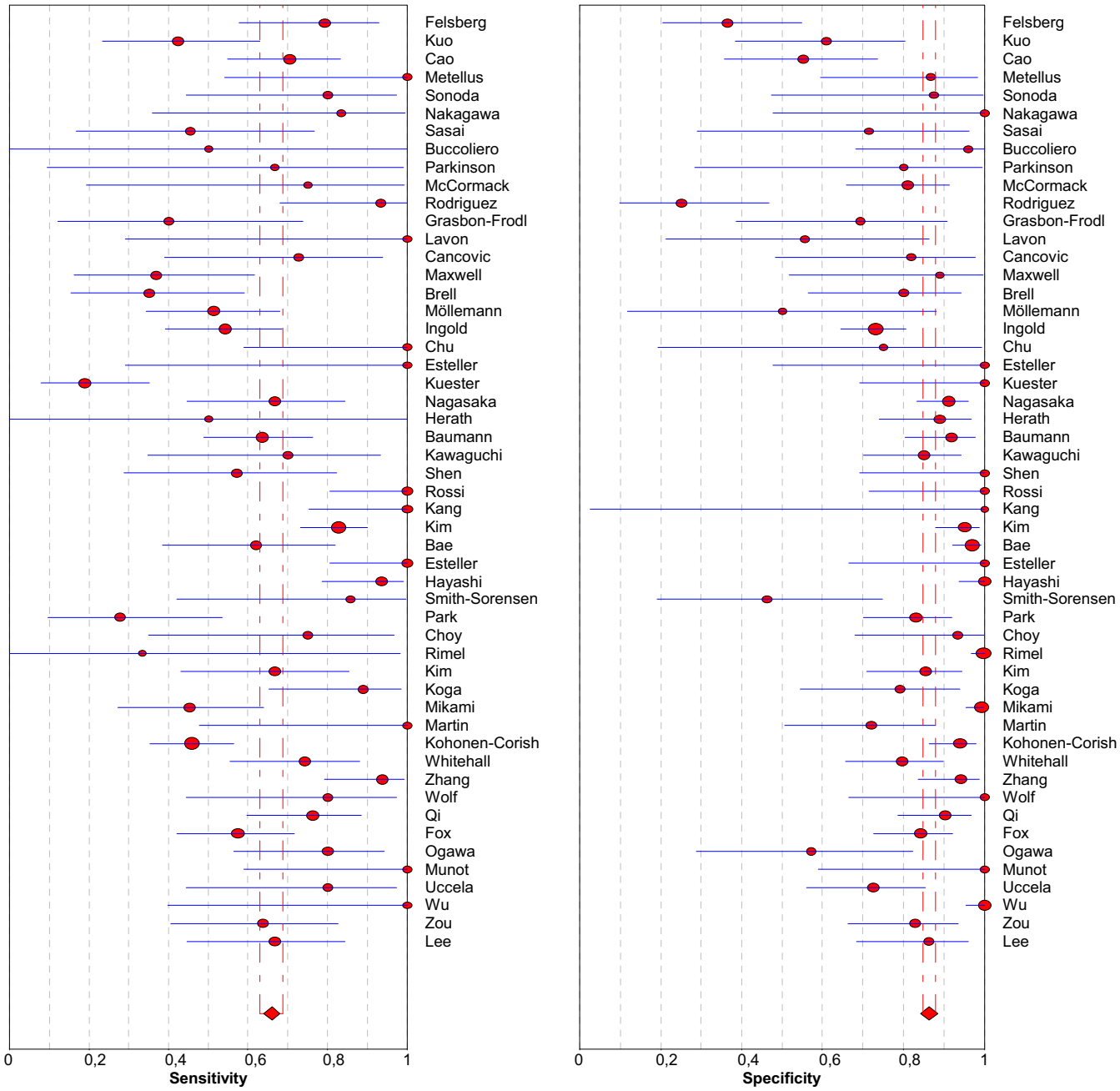
Shen et al., 2005	8	0	6	10	0.571	0.289 - 0.823	1.000	0.692 - 1.000	0.454	0.251 - 0.821	12.46	0.802 - 193.8	27.462	1.347 - 560.06
Kang et al., 2004	13	0	0	1	1.000	0.753 - 1.000	1.000	0.025 - 1.000	0.048	0.003 - 0.813	3.857	0.349 - 42.62	81.000	1.135 - 5778.7
Rossi et al., 2004	17	0	0	11	1.000	0.805 - 1.000	1.000	0.715 - 1.000	0.029	0.002 - 0.447	23.33	1.545 - 352.2	805.00	14.8- 43510.8
Kim et al., 2003	72	4	15	78	0.828	0.732 - 0.900	0.951	0.880 - 0.987	0.181	0.114 - 0.288	16.96	6.492 - 44.33	93.600	29.681 - 295.1
Zhang et al., 2003	30	3	2	48	0.938	0.792 - 0.992	0.941	0.838 - 0.988	0.066	0.017 - 0.255	15.93	5.297 - 47.94	240.00	37.87 - 1520.9
Bae et al., 2002	13	4	8	124	0.619	0.384 - 0.819	0.969	0.922 - 0.991	0.393	0.228 - 0.679	19.81	7.134 - 55.00	50.375	13.332 - 190.3
Choy et al., 2002	6	1	2	14	0.750	0.349 - 0.968	0.933	0.681 - 0.998	0.268	0.080 - 0.896	11.25	1.624 - 77.92	42.000	3.170 - 556.48
Esteller et al., 2002	17	0	0	9	1.000	0.805 - 1.000	1.000	0.664 - 1.000	0.029	0.002 - 0.451	19.44	1.303 - 290.1	665.00	12.1- 36261.5
Hayashi et al., 2002	29	0	2	56	0.935	0.786 - 0.992	1.000	0.936 - 1.000	0.079	0.024 - 0.259	105.0	6.64 - 1662.9	1333.4	61.9 - 28690.6
Smith-Sorensen et al., 2002	6	7	1	6	0.857	0.421 - 0.996	0.462	0.192 - 0.749	0.310	0.046 - 2.084	1.592	0.885 - 2.863	5.143	0.475 - 55.642
Park et al., 2001	5	9	13	44	0.278	0.097 - 0.535	0.830	0.702 - 0.919	0.870	0.637 - 1.188	1.636	0.630 - 4.245	1.880	0.535 - 6.604
Whitehall et al., 2001	23	10	8	39	0.742	0.554 - 0.881	0.796	0.657 - 0.898	0.324	0.176 - 0.599	3.635	2.014 - 6.563	11.213	3.873 - 32.459
Wolf et al., 2001	8	0	2	9	0.800	0.444 - 0.975	1.000	0.664 - 1.000	0.239	0.080 - 0.718	15.45	1.017 - 234.7	64.600	2.702 - 1544.5
Esteller et al., 1999	3	0	0	5	1.000	0.292 - 1.000	1.000	0.478 - 1.000	0.136	0.010 - 1.843	10.50	0.720 - 153.0	77.000	1.223 - 4848.9

S Acumulada 0.660 [0.631 - 0.688] E Acumulada 0.851 [0.834 - 0.868] LR-Acumulado 0.404 [0.331 - 0.493] LR+ Acumulado 4.051 [3.0 - 5.47] ORdAcumulado 12.9 [8.433 - 19.975]

VP: Verdadero Positivo; FP: Falso Positivo; FN: Falso Negativo; VN: Verdadero Negativo; S: Sensibilidad; E.: Especificidad; IC: Intervalo de Confianza; LR+: Likelihood Ratio Positiva; LR+: Likelihood Ratio Negativa; ORd: Odds Ratio Diagnóstica

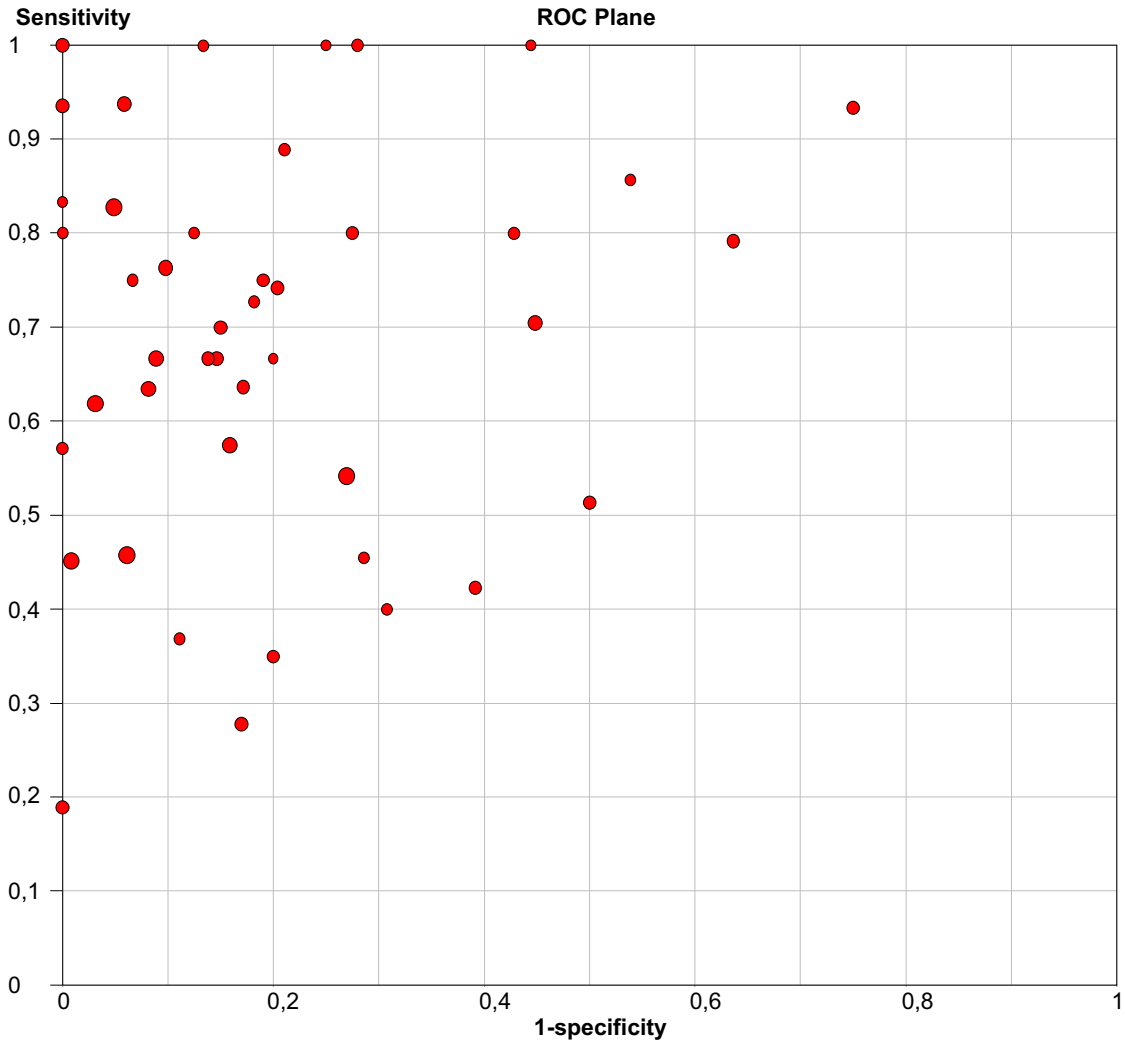
En esta fase tan precoz del análisis, el resultado obtenido de la combinación de estos estimadores de precisión (S acumulada, E acumulada, etc.) carece de valor real y debe considerarse con precaución, dada la más que probable presencia de heterogeneidad estadística, tal y como sugiere la inspección visual de los "gráficos de bosque" y del "gráfico de espacios ROC" (Figura II.3. y II.4.).

Figura II.3: Gráficos de bosque ("*forest-plots*") para sensibilidad y especificidad.



Como puede observarse, la representación gráfica corresponde al formato estándar empleado habitualmente en las Revisiones Sistemáticas. El resultado principal de cada uno de los estudios incluídos se muestra como una linea horizontal que representa el IC del 95% de la sensibilidad o especificidad en cada caso, y en ella un círculo que representa el valor de la estimación puntual observada en dicho estudio. El rombo representado en la parte inferior del gráfico corresponde al resultado global obtenido de la combinación de los resultados individuales de todos los estudios. Resulta evidente a la simple inspección visual de los gráficos, que los valores estimados para la S y la E de cada una de las series individuales incluidas, no se localizan centrados sobre el valor correspondiente a la estimación conjunta (representado con el rombo), sino que muestran una importante dispersión, lo que sugiere la presencia de heterogeneidad.

Figura II.4.: Representación gráfica del espacio ROC para sensibilidad contra (1-especificidad) de cada estudio.



Ante la sospecha de heterogeneidad se procedió en primer lugar, a explorar la posible existencia del llamado "efecto umbral", ya que tal como se ha expuesto en el apartado de Material y Métodos, éste constituye la principal causa de heterogeneidad en los estudios sobre precisión de tests diagnósticos. Para ello se calculó el coeficiente de correlación de Spearman, entre el logit de la sensibilidad y el logit de 1-especificidad, obteniéndose una asociación no significativa tanto en el análisis de la serie de estudios completa (n=52, coeficiente de correlación de Spearman 0.022; p=0.881), como en un sub-análisis realizado sobre el grupo de trabajos en los que se efectuó una valoración semicuatitativa de la expresión inmunohistoquímica (n=36, coeficiente de correlación de Spearman 0.037; p=0.833). Estos resultados sugieren que la heterogeneidad, no parece, a priori, deberse al llamado "efecto umbral".

Lo que sí quedó objetivado fue la presencia de heterogeneidad estadística para la sensibilidad [chi-cuadrado=234.28; df=42 (p<0.0001), índice de inconsistencia (I^2)=79.5%], especificidad [chi-cuadrado=300.84; df=48 (p<0.0001), I^2=84%], likelihood-ratio positivo [Q de Cochrane=265.33; df=48 (p<0.0001), I^2=81.9%], likelihood-ratio negativo [Q de Cochrane =201.46; df=48 (p<0.0001), I^2=76.2%], y odds ratio diagnostica [Q de Cochrane=143.88; df=48 (p<0.0001), I^2=66.6%], debiéndose por ello investigar otras posibles causas de la misma.

Para ello se realizó a continuación un análisis de meta-regresión incluyendo las siguientes covariables:

1) Tipo de muestra empleado, ya que es bien conocido que la calidad del ADN que se obtiene a partir de muestras parafinadas es, en ocasiones, insuficiente para la consecución de un resultado concluyente en la MSP (Mikeska et al., 2007).

2) Tipo de anticuerpo comercial empleado, debido a que la mejor concordancia de resultados entre la MSP y la IHQ parace alcanzarse con el anticuerpo MT23.2 (Preusser, 2009).

3) Tipo de tumor analizado (tumor cerebral *vs* sistémico).

Tal como puede observarse en la Tabla II.8., los resultados de este primer análisis de meta-regresión mostraron que la precisión diagnóstica de la IHQ está fuertemente asociada al tipo de tumor (ratio de la odds ratio diagnóstica: RDOR 5.36; 95% CI[2.42-11.86], p<0.01).

Tabla II.8.: Resultados del análisis de meta-regresión para todos los estudios.

Meta-Regresión (*Inverse Variance weights*) (1)

Covariable	Coeficiente	Error estándar	p	RDOR	[IC 95%]
Cte.	1.650	0.4579	0.0008	---	---
S	0.012	0.1262	0.9273	---	---
Tumor cerebral *vs* otros	1.702	0.4294	0.0003	5.49	[2.31-13.03]
Tipo de anticuerpo	-0.110	0.2486	0.6599	0.90	[0.54-1.46]
Parafina *vs* tejido congelado	-0.128	0.2657	0.6315	0.88	[0.51-1.50]

Meta-Regresión (*Inverse Variance weights*) (2)

Covariable	Coeficiente	Error estándar	p	RDOR	[IC 95%]
Cte.	1.521	0.3667	0.0001	---	---
S	0.010	0.1243	0.9393		
Tumor cerebral *vs* otros	1.648	0.4030	0.0002	5.19	[2.31-1.70]
Parafina *vs* tejido congelado	-0.135	0.2600	0.6057	0.87	[0.52-1.47]

Meta-Regresión (*Inverse Variance weights*) (3)

Covariable	Coeficiente	Error estándar	p	RDOR	[IC 95%]
Cte.	1.406	0.2976	0.0000	---	---
S	0.001	0.1222	0.9939	---	---
Tumor cerebral *vs* otros	1.679	0.3947	0.0001	5.36	[2.42-11.86]

RDOR: Ratio de Odds Ratio Diagnóstico de la covariable correspondiente; S: Coeficiente S; Cte: Constante.

A continuación, se realizó un segundo análisis de meta-regresión sobre el subgrupo de los 36 estudios en los que se analizó la inmunoexpresión de manera semicuantitativa. En este caso el punto de corte en la IHQ considerado como umbral de positividad por los autores fue incluido también como covariable (Tabla II.9.).

Tabla II.9.: Resultados del análisis de meta-regresión para el subgrupo de los 36 estudios en los que se analizó la inmunoexpresión de manera semicuantitativa.

Meta-Regresión (*Inverse Variance weights*) (1)

Covariable	Coeficiente	Error estándar	p	RDOR	[IC 95%]
Cte.	0.191	0.5048	0.0252	---	---
S	-0.012	0.1520	0.9372	---	---
Tumor cerebral *vs* otros	1.299	0.5068	0.0158	3.67	[1.30-10.34]
Tipo de anticuerpo	0.025	0.3022	0.9358	1.02	[0.55-1.90]
Parafina *vs* tejido congelado	-0.054	0.2893	0.8541	0.95	[0.52-1.71]
Punto de corte	0.329	0.2146	0.1362	1.39	[0.90-2.15]

Meta-Regresión (*Inverse Variance weights*) (2)

Covariable	Coeficiente	Error estándar	p	RDOR	[IC 95%]
Cte.	1.348	0.4925	0.0103	---	---
S	-0.010	0.1509	0.9417	---	---
Tumor cerebral *vs* otros	1.341	0.5047	0.0125	3.82	[1.36-10.71]
Tipo de anticuerpo	0.127	0.2939	0.6677	1.14	[0.62-2.07]
Parafina *vs* tejido congelado	-0.114	0.2857	0.6939	0.89	[0.50-1.60]

Meta-Regresión (*Inverse Variance weights*) (3)

Covariable	Coeficiente	Error estándar	p	RDOR	[IC 95%]
Cte.	1.259	0.4445	0.0081	---	---
S	-0.009	0.1487	0.9506	---	---
Tumor cerebral *vs* otros	1.395	0.4802	0.0067	4.03	[1.52-10.77]
Tipo de anticuerpo	0.111	0.2848	0.6996	1.12	[0.63-2.00]

Meta-Regresión (*Inverse Variance weights*) (4)

Covariable	Coeficiente	Error estándar	p	RDOR	[IC 95%]
Cte.	1.376	0.3022	0.0001	---	---
S	-0.003	0.1466	0.9811	----	---
Tumor cerebral *vs* otros	1.478	0.4306	0.0017	4.38	[1.82-10.54]

RDOR: Ratio de Odds Ratio Diagnóstico de la covaraible correspondiente; S: Coeficiente S; Cte: Constante.

Sorprendentemente, una vez más el tipo de tumor (cerebral *vs* otros) resultó ser la covariariable independiente con mayor influencia en el rendimiento diagnóstico de la IHQ, por encima incluso del punto de corte, el tipo de tejido o el tipo de anticuerpo empleados.

De estos resultados podemos inferir que, el análisis inmunohistoquimico de la expresión de la proteina MGMT en los tumores cerebrales, presenta 4 veces menos precisión diagnóstica que en otro tipo de tumores de la economía sistémica (RDOR 4.38; 95% CI[1.82-10.54], p=0.0017).

En la última parte del análisis, se realizó una combinación ponderada de los estimadores de los estudios individuales. Para ello, se definieron subgrupos persiguiendo la máxima homogeneidad posible en ellos. La definición de estos subgrupos se realizó en base al punto de corte para la IHQ y a las covariables con significación estadística en el análisis de meta-regresión.

Al definirse subgrupos de estudios homogéneos se descarta el "efecto umbral explícito", es decir el debido a considerar distinto punto de corte en la IHQ. Sin embargo, incluso en el caso de considerar idéntico valor umbral, la realización e interpretación de los resultados de

cualquier test diagnóstico está indefectiblemente sometida a cierta subjetividad del observador, a pequeñas variaciones del protocolo o de la técnica entre los diferentes laboratorios etc. y ello puede teoricamente ser también causa de un "efecto umbral implícito". Por este motivo se efectuó de nuevo el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman para cada uno de los subgrupos, quedando descartado en todos ellos "efecto umbral" de cualquier tipo.

En conjunto, los resultados de la combinación ponderada de los estimadores fueron de 0.53; 95%IC[0.33-0.73] a 0.79; 95%IC[0.73-0.84] para la sensibibidad y de 0.60; 95%IC [0.52-0.67] a 0.93; 95%IC[0.91-0.95] para la especificidad (Tabla II.10.).

Tabla II.10.: Resumen de resultados

Subgrupo (nº de estudios)	Coef. de correlación Spearman	Sensibilidad Combinada [IC]	Especificidad Combinada [IC]	LR+ Combinada [IC]	LR- Combinada [IC]	DOR Combinada [IC]
Análisis IHC Semicuantitativo (36)	0.037 p = 0.833	0.666 [0.630-0.700]	0.802 [0.777-0.826]	3.156 [2.315-4.301]	0.10 [0.315-0.534]	9.494 [5.755-15.664]
Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 150.58 p < 0,001	chi-cuadrado = 202.01 p < 0,001	Q-Cochran = 169.80 p < 0,001	Q-Cochran = 160.93 p < 0,001	Q-Cochran = 99.09 p < 0,001
Test de Inconsistencia		I^2 = 77.4 %	I^2= 83.2 %	I^2= 80 %	I^2= 78.9 %	I^2= 65.7 %
Tumores cerebrales + análisis IHC semicuantitativo (14)	0.113 p = 0.666	0.614 [0.556–0.670]	0.671 [0.622–0.718]	1.800 [1.400–2.320]	0.630 [0.500–0.780]	3.470 [2.180–5.530]
Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 51.51 p < 0.001	chi-cuadrado = 54.99 p < 0.001	Q-Cochran = 30.22 p = 0.016	Q-Cochran = 22.33 p = 0.132	Q-Cochran = 30.34 p = 0.205
Test de Inconsistencia		I^2 = 68.9 %	I^2 = 70.9 %	I^2 = 47.1 %	I^2 = 28.4 %	I^2 = 21.3 %
Umbral > 5% (4)		0.597 [0.507–0.682]	0.723 [0.655–0.785]	1.900 [1.450–2.500]	0.600 [0.450–0.810]	3.420 [2.060–5.670]
Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 10.14 p = 0.038	chi-cuadrado = 8.32 p = 0.800	Q-Cochran = 3.58 p = 0.465	Q-Cochran = 5.70 p = 0.223	Q-Cochran = 4.02 p = 0.402

Test de Inconsistencia		$I^2 = 60.6$ %	$I^2 = 51.9$ %	$I^2 = 0.0$ %	$I^2 = 29.8$ %	$I^2 = 0.6$ %
Umbral > 10% (9)		0.645 [0.559–0.724]	0.601 [0.525–0.674]	1.70 [1.200–2.330]	0.600 [0.390–0.930]	3.390 [1.540–7.430]
Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 29.16 p = 0.001	chi-cuadrado = 37.94 p < 0.001	Q-Cochran = 19.43 p = 0.021	Q-Cochran = 14.06 p = 0.120	Q-Cochran = 13.94 p = 0.124
Test de Inconsistencia		$I^2 = 69.1$ %	$I^2 = 76.3$ %	$I^2 = 53.7$ %	$I^2 = 36$ %	$I^2 = 35.4$%
Umbral > 20% (1)		0.538 [0.334– 0.734]	0.846 [0.546–0.981]	3.186 [1.052–9.653]	0.333 [0.027–4.152]	8.620 [1.289–57.628]
Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 10.88 p = 0.001	chi-cuadrado = 0.39 p = 0.535	Q-Cochran = 0.00 p = 0.960	Q-Cochran = 3.57 p = 0.059	Q-Cochran = 0.92 p = 0.338
Test de Inconsistencia		$I^2 = 90.8$ %	$I^2 = 0.0$ %	$I^2 = 0.0$ %	$I^2 = 71.9$ %	$I^2 = 0.0$%
Otros tumores + análisis IHC semicuantitativo (18)	-0.029 p = 0.909	0.702 [0.655–0.745]	0.79 [0.851–0.903]	4.790 [3.070–7.470]	0.310 [0.200–0.490]	18.240 [9.550–34.830]
Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 93.19 p < 0.001	chi-cuadrado = 82.87 p < 0.001	Q-Cochran = 64.12 p < 0.001	Q-Cochran = 147.89 p < 0.001	Q-Cochran = 42.37 p < 0.001
Test de Inconsistencia		$I^2 = 81.8$%	$I^2 = 79.5$ %	$I^2 = 73.5$ %	$I^2 = 88.5$ %	$I^2 = 59.9$ %
Umbral > 5% (3)		0.606 [0.507–0.698]	0.805 [0.742–0.859]	2.830 [1.590–5.060]	0.490 [0.290–0.820]	7.220 [2.950–17.690]

Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 12.08 p = 0.017	chi-cuadrado = 14.28 p = 0.006	Q-Cochran = 11.93 p = 0.017	Q-Cochran = 15.56 p = 0.003	Q-Cochran = 7.55 p = 0.109
Test de Inconsistencia		I^2 = 66.9 %	I^2 = 72 %	I^2 = 66.5 %	I^2 = 74.3 %	I^2 = 47 %
Umbral > 10% (8)		0.796 [0.735–0.849]	0.907 [0.871–0.935]	6.350 [3.210–12.550]	0.250 [0.190–0.330]	26.210 [11.210–61.260]
Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 6.25 p = 0.511	chi-cuadrado = 34.06 p < 0.001	Q-Cochran = 26.66 p < 0.001	Q-Cochran = 6.17 p = 0.520	Q-Cochran = 15.26 p = 0.032
Test de Inconsistencia		I^2 = 0.0 %	I^2 = 79.4%	I^2 = 73.7 %	I^2 = 0.0 %	I^2 = 54.1 %
Umbral > 20%★ (1)		1.000 [0.478–1.000]	0.720 [0.506–0.879]	3.178 [1.659–6.088]	0.117 [0.008–1.683]	27.133 [1.328–554.24]
Análisis IHC cualitativo (14)	0.008 p = 0.979	0.649 [0.598–0.698]	0.932 [0.910–0.951]	7.620 [4.670–12.440]	0.390 [0.239–0.520]	27.760 [13.230–58.270]
Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 83.40 p < 0.001	chi-cuadrado = 40.08 p < 0.001	Q-Cochran = 27.10 p = 0.012	Q-Cochran = 40.88 p < 0.001	Q-Cochran = 30.420 p = 0.004
Test de Inconsistencia		I^2 = 84.4 %	I^2 = 67.6 %	I^2 = 52.5 %	I^2 = 68.2 %	I^2 = 57.3 %
Tumores cerebrales + análisis IHC cualitativo (2)	n.a.	0.571 [0.289–0.823]	0.833 [0.516–0.979]	2.891 [0.486–17.176]	0.441 [0.063–3.065]	7.942 [0.256–245.97]

Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 3.96 p = 0.047	chi-cuadrado = 2.44 p = 0.118	Q-Cochran = 1.64 p = 0.201	Q-Cochran = 2.37 p = 0.123	Q-Cochran = 2.38 p = 0.123
Test de Inconsistencia		I^2 = 74.8 %	I^2 = 59 %	I^2 = 38.9 %	I^2 = 57.9 %	I^2 = 57.9 %
Otros tumores + análisis IHC cualitativo (12)	0.195 p = 0.544	0.652 [0.600–0.720]	0.934 [0.912–0.953]	8.500 [5.150–14.040]	0.370 [0.270–0.510]	32.23 [15.190–68.370]
Test de Heterogeneidad		chi-cuadrado = 79.06 p < 0.001	chi-cuadrado = 36.24 p < 0.001	Q-Cochran = 22.67 p = 0.019	Q-Cochran = 37.73 p < 0.001	Q-Cochran = 25.34 p = 0.008
Test de Inconsistencia		I^2 = 86.1 %	I^2 = 69.6 %	I^2 = 51.5 %	I^2 = 70.8 %	I^2 = 56.6 %

★ Sólo 1 estudio; n.a.: no aplicable

Para obtener una valoración específica de la precisión diagnóstica de la IHQ en los distintos subgrupos con idéntico punto de corte, se calculó para cada uno de ellos el índice Q* y el área bajo la curva (ABC). La Figura II.5. muestra los resultados del índice Q* y el ABC para las series de tumores cerebrales, siendo 0.64 el índice Q* y 0.68 el ABC, mientras que en la Figura II.6. se muestra lo propio para las series de tumores sistémicos, siendo el índice Q* de 0.80 y el ABC 0.87.

Figura II.5.: Curva SROC para las series de tumores cerebrales y valoración IHQ semicuantitativa.

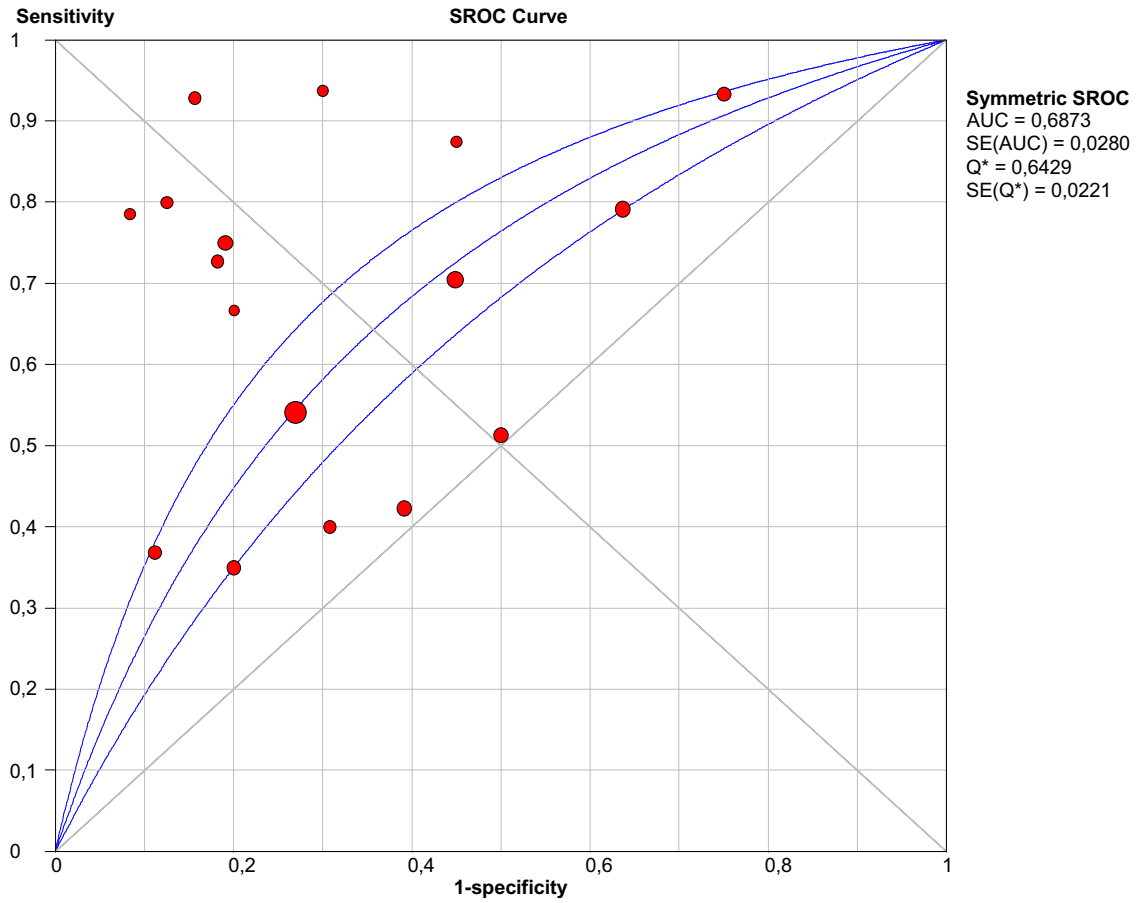
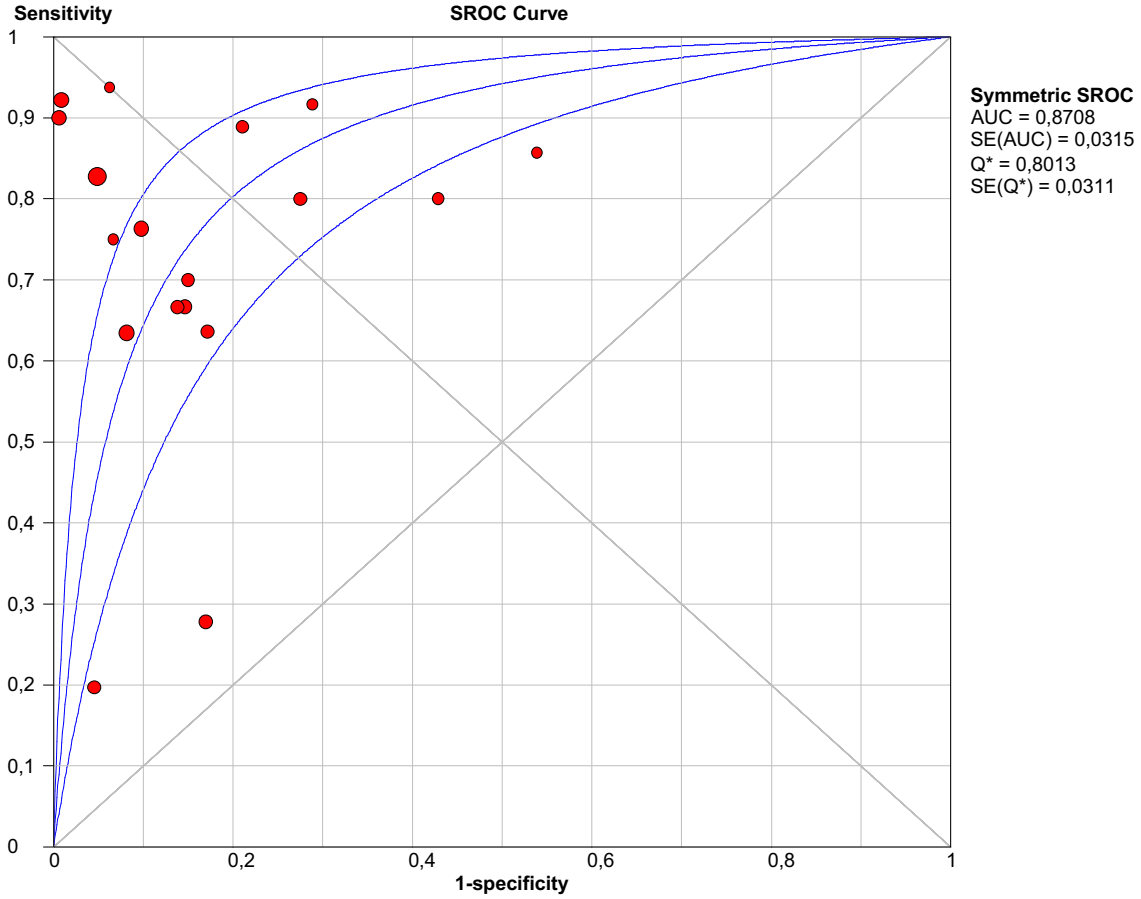


Figura II.6.: Curva SROC para las series de tumores sistémicos y valoración IHQ semicuantitativa.



Como queda patente de todos estos resultados, el rendimiento diagnóstico de la IHQ es significativamente superior en tumores sistémicos respecto a los tumores cerebrales. La comparación en términos estadísticos del ABC de ambos gráficos mediante el cálculo del estadístico-z lo demuestra: estadístico-z 4.354, $p<0.0001$.

Esta significación estadística se mantiene incluso al comparar las ABC en el análisis conjunto de todos los estudios y no unicamente en los subgrupos homogéneos (estadístico-z 5.722, p<0.0001) (Figura II.7. y Figura II.8.).

Figura II.7.: Curva SROC para todas las series de tumores cerebrales.

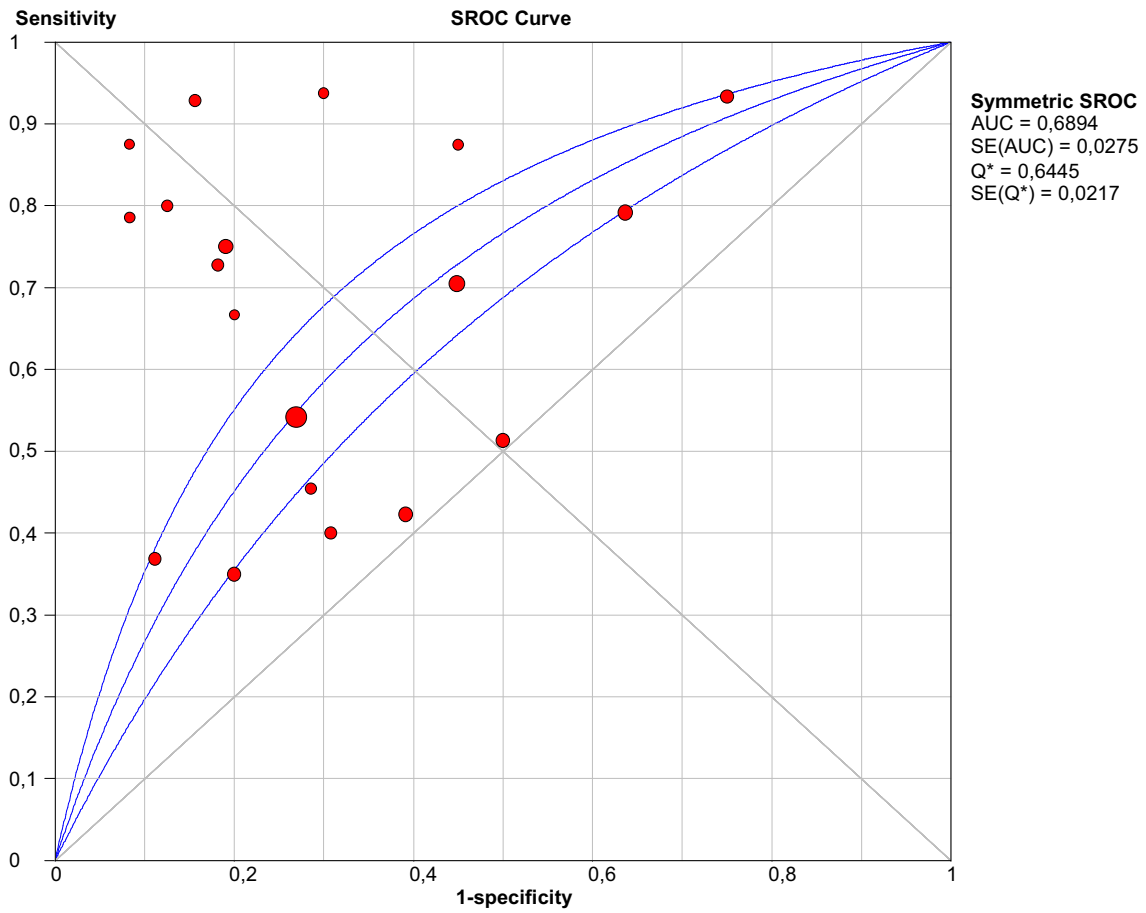
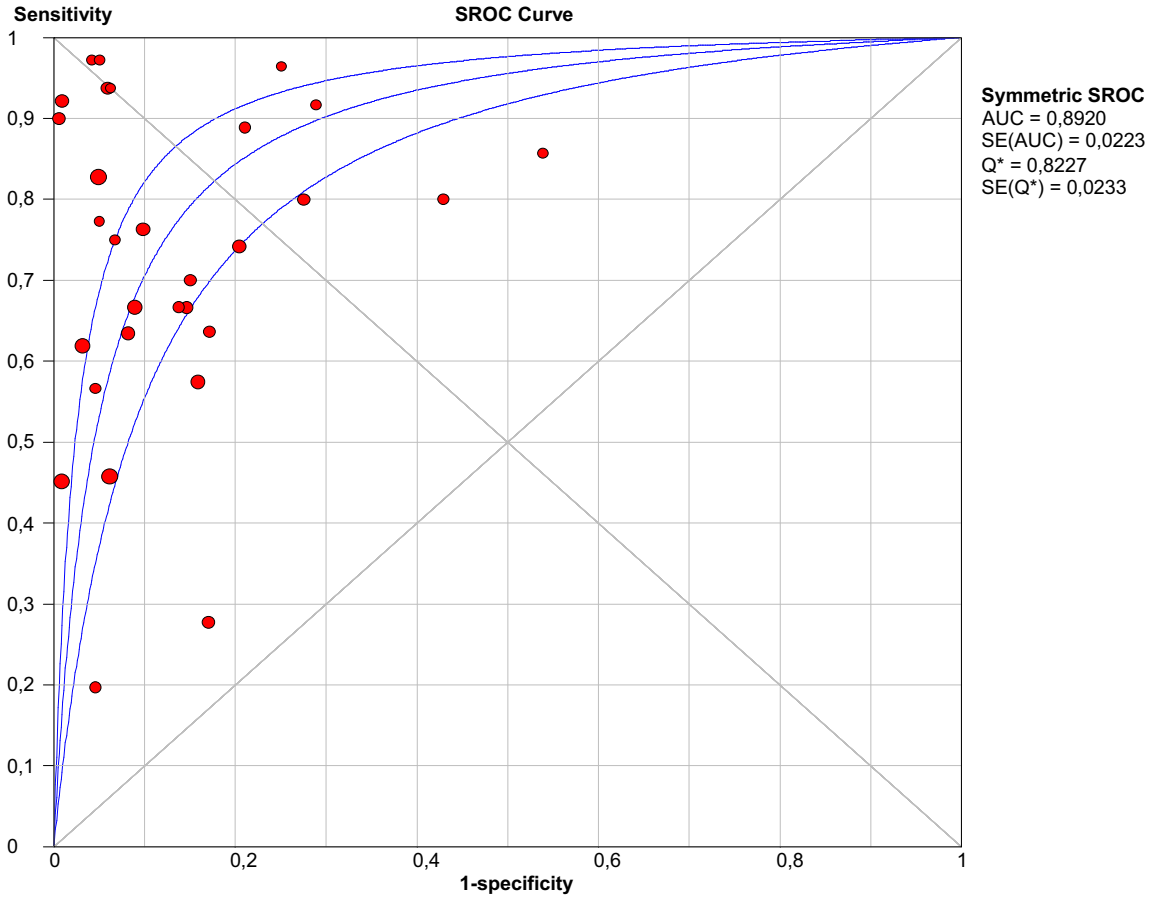
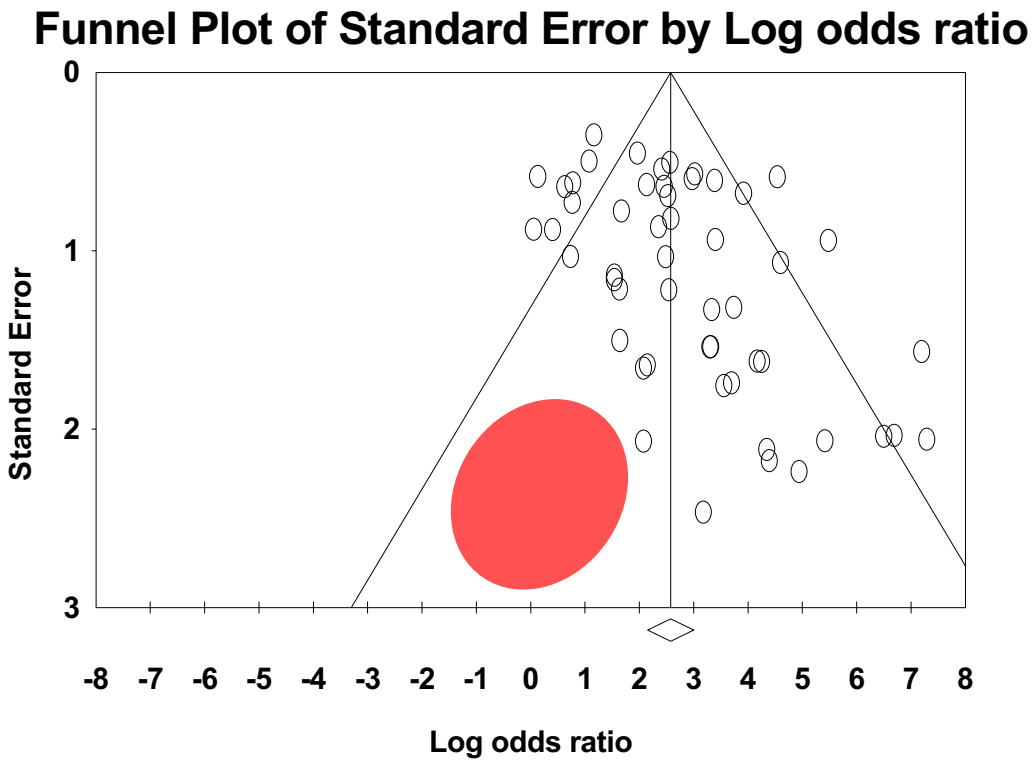


Figura II.8.: Curva SROC curve para todas las series de tumores sistémicos.



Finalmente, se investigó la posibilidad de sesgo de publicación. El "gráfico de embudo" mostró una distribución asimétrica de los puntos correspondientes a los estudios seleccionados para el análisis (Figura II.9.). En rojo se muestra el área del gráfico responsable de la asimetría por carencia de estudios a este nivel. El test de regresión de Egger confirma los hallazgos de la simple inspección visual del gráfico corroborando la presencia de un cierto grado de sesgo de publicación: Intercept 1.55; 95%CI[0.61-2.49], p=0.002.

Figura II.9: "Gráfico de embudo" para valoración del sesgo de publicación



6. DISCUSIÓN

6.1. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DE TESTS DIAGNÓSTICOS: REVISIONES SISTEMÁTICAS Y META-ANÁLISIS

Los test de laboratorio se emplean para detectar o excluir la presencia de una determinada condición en una población constituida por sujetos (pacientes, tumores, etc.) que la presentan o no. La capacidad del test para distinguir la presencia de la ausencia de la condición de estudio es lo que comúnmente se conoce como precisión diagnóstica de dicho test (Vamvakas, 1998). Esta capacidad posee dos componentes. La sensibilidad determina la capacidad del test para detectar la enfermedad en los sujetos que la padecen, en nuestro caso, la capacidad de la IHQ para descartar la expresión de proteína MGMT en los tumores cuyo promotor está metilado. La especificidad por el contrario, determina la capacidad del test para excluir la presencia de enfermedad en los individuos sanos, en nuestro caso la capacidad de la IHQ para detectar inmunoexpresión de MGMT en los tumores cuyo promotor no está metilado. Desde que se propone la utilización de un determinado test diagnóstico hasta que se incorpora de manera rutinaria a la práctica clínica es necesario que se produzca un proceso de evaluación del mismo (Meads y Davenport, 2009; Zamora Romero et al., 2009). Durante éste pueden sucederse conflictos generados por las diferencias observadas en los resultados publicados por los diversos grupos de investigación que han empleado dicho test diagnóstico con anterioridad. Por ello, no es infrecuente observar una falta de consenso o acuerdo entre profesionales en momentos en los que además, el *marketing* ejerce una fuerte presión.

Asistimos en la actualidad a un escenario en el que aparecen 17.000 libros y unas 30.000 revistas biomédicas nuevas cada año, con un incremento anual de un 7% (Smith, 1991). Para mantenerse actualizado un médico necesitaría leer un promedio 17 artículos originales cada día (Davidoff et al., 1995).

Ante este creciente número de publicaciones que sobrepasa las posibilidades de mantenerse al día y que ha sido definida por algunos autores como una “explosión de información”, se ha generado la necesidad de lo que algunos han denominado el “antídoto”. Ese antídoto es precisamente el Meta-análisis, ya que supone la herramienta adecuada para efectuar una síntesis de la mejor evidencia disponible (Ortiz, 2005).

La evaluación de la precisión de un test diagnóstico no es una excepción, y por ello, cada vez son más frecuentes en la literatura las Revisiones Sistemáticas y los Meta-análisis que valoran el rendimiento de pruebas diagnósticas, su eficiencia etc. (Weswood et al., 2005)

Como se ha señalado previamente, las Revisiones Sistemáticas se definen como aquellas revisiones estructuradas de la literatura científica en las que se emplea metodología sistematizada para identificar, seleccionar y analizar los estudios relevantes que hacen referencia a una determinada cuestión. Aunque pueda parecer una obviedad, el objetivo de toda Revisión Sistemática es reducir los posibles sesgos que pueden ocurrir en una revisión no sistemática.

El Meta-análisis es el método estadístico que se emplea en las Revisiones Sistemáticas para integrar los resultados de todos los estudios incluidos e incrementar, de este modo, la potencia estadística de los mismos (Halligan, 2005). Dicho de otro modo, es el análisis estadístico de una colección amplia de resultados de estudios individuales con el propósito de integrar sus hallazgos en forma de estimadores conjuntos (Ortiz, 2005). Es, por lo tanto, la integración estructurada y sistemática de la información de varios estudios (Vamvakas, 1998).

Si bien existe un paralelismo con las homólogas revisiones sobre eficacia de intervenciones terapéuticas, las Revisiones Sistemáticas sobre el rendimiento de tests diagnósticos tienen ciertas peculiaridades. A diferencia de las fases del ensayo clínico perfectamente consensuadas y establecidas, el marco conceptual para la evaluación de los tests diagnósticos ha sido motivo de profunda reflexión en la comunidad científica, y ha evolucionado de manera sustantiva a lo largo de los últimos años (Merlin et al., 2009).

Las principales diferencias entre los Meta-análisis sobre eficacia terapéutica y aquellos sobre rendimiento de tests diagnósticos son, en primer lugar, que todos los sujetos incluidos en un ensayo clínico controlado presentan la enfermedad de interés, mientras que en los estudios sobre rendimiento diagnóstico se incluyen sujetos con o sin la enfermedad problema (en nuestro caso tumores con y sin metilación del promotor de *MGMT*).

En segundo lugar, los estudios sobre eficacia de intervenciones terapéuticas miden un solo parámetro, esto es, el efecto de la intervención sobre los pacientes tratados. Por el contrario, en los estudios sobre precisión diagnóstica de un test se cuantifican dos parámetros, a saber, la S y la E del test problema, que además son interdependientes.

En la actualidad las Revisiones Sistemáticas sobre precisión de tests diagnósticos son evaluaciones globalizadoras que consideran tanto aspectos puramente técnicos de factibilidad y reproducibilidad, como aspectos más relacionados con la validez de los resultados, con el impacto socioeconómico de su implementación en la rutina diaria, o con el contexto clínico donde podrá y/o tendrá que aplicarse la prueba. Sin embargo, debido a que son más recientes

que las relacionadas con intervenciones terapéuticas están menos estandarizadas que éstas, y se encuentran todavía en proceso de desarrollo (Van den Bruel et al., 2007).

El proceso de Revisión Sistemática de estudios sobre rendimiento de pruebas diagnósticas, sigue las fases habituales y propias de toda Revisión Sistemática:

1.- En primer lugar se debe plantear el objetivo de la revisión.

2.- A continuación se realizará una búsqueda bibliográfica y una selección de los artículos que serán incluidos en el análisis.

3.- Posteriormente se procederá a la evaluación de las características y de la calidad metodológica de los trabajos incluidos.

4.- Finalmente se efectuará el análisis estadístico de los resultados (Meta-análisis).

Sin embargo, en la Tabla II.11. se muestra algunas de las principales diferencias entre los Meta-análisis de ensayos clínicos randomizados y los Meta-análisis de estudios sobre precisión de test diagnósticos:

Tabla II.11. Principales diferencias entre los Meta-análisis de ensayos clínicos randomizados y los Meta-análisis de estudios sobre precisión de test diagnósticos
(Vamvakas, 1998)

Partes de un Meta-análisis	
Meta-análisis de ensayos clínicos randomizados	**Meta-análisis de estudios sobre precisión de test diagnósticos**
1. Búsqueda e identificación de la bibliografía referente al efecto de la intervención de interés.	1. Búsqueda e identificación de la bibliografía referente al rendimiento diagnóstico del test de interés.
2. Selección de los estudios que serán incluidos en el análisis y determinación de la calidad de los mismos.	
3. Extracción de los datos referentes al efecto de la intervención de estudio.	3. Extracción de los datos correspondientes a tasa de verdaderos positivos (S) y falsos positivos (1-E)
4. Valoración del grado de concordancia entre los estudios (mediante el estadístico *Q*)	4. Valoración del "efecto umbral" y de su influencia el los valores de S y E de los estudios.
5. Si existe concordancia entre los estudios, calcular la media u otra medida global del efecto de la intervención.	5. Calcular la curva ROC conjunta de la precisión diagnóstica del test en todos los estudios considerados en su conjunto.
6. Si los estudios son discordantes, examinar las posibles razones de ello.	6. Investigar otras posibles causas de heterogeneidad estadística.

En lo que se refiere al objetivo, es aconsejable que la Revisión Sistemática se centre en la evaluación del rendimiento de una determinada prueba diagnóstica (la IHQ en el caso que nos ocupa), respecto a la considerada como patrón de referencia (la MSP), sin abordar una comparación explícita con otras pruebas alternativas (Zamora Romero et al., 2009), y así se hizo en nuestro estudio.

Por todo lo referido hasta el momento, a diferencia de las Revisiones Sistemáticas sobre eficacia de intervenciones o tratamientos cuyos resultados o conclusiones resultan fácilmente aplicables a la toma de decisiones de la práctica clínica diaria, los resultados obtenidos de los estudios sobre precisión de tests diagnósticos pueden resultar más complejos de extrapolar, siendo en ocasiones más útiles para los gestores de la sanidad que para los propios clínicos.

En el presente capítulo se analiza un problema concreto presente en la rutina de la práctica clínica de nuestros días, con la pretensión por parte de los autores de que los resultados que se deriven del mismo puedan resultar útiles en la toma de ciertas decisiones.

La búsqueda bibliográfica realizada ha sido exhaustiva, objetiva y reproducible, y no se ha limitado simplemente a las bases de datos electrónicas sino que se ha complementado con una búsqueda manual a partir de las listas de referencias bibliográficas de los diversos artículos evaluados, tal y como se ha expuesto en el apartado de Material y Métodos del presente capítulo.

Debido a que la búsqueda de artículos relacionados con tests diagnósticos presenta más dificultades que la de trabajos relacionados con ensayos clínicos, y que además no existe ninguna base de datos centralizada para estudios sobre precisión de tests diagnósticos, en la presente Revisión Sistemática no se emplearon filtros metodológicos para restringir o focalizar la búsqueda, siguiendo las recomendaciones de los expertos (Leeflang et al., 2006).

La evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos es un aspecto clave de toda Revisión Sistemática ya que permite identificar posibles sesgos. En la presente revisión se analizó la calidad del diseño y ejecución de los estudios, y además se valoró la forma en la que los autores comunicaban los resultados. Para ello se empleó el cuestionario de calidad QUADAS diseñado específicamente para este propósito. Una cuestión aparte es el uso que puede hacerse de los resultados obtenidos de este análisis de calidad, y de hecho, este aspecto continúa siendo en la actualidad motivo de debate. En términos generales, parece haber consenso de expertos en que resulta desaconsejable resumir la calidad de los trabajos en forma de puntuación numérica, o incorporar la calidad en la ponderación de los estudios a la hora de analizar los datos (Whiting et al., 2005; Zamora Romero et al., 2009). Por ello ninguna de estas dos acciones fue llevada a cabo en la presente revisión. La valoración de cada uno de los ítems de la herramienta QUADAS debe mostrarse de manera invididual (Weswood et al., 2005).

Los estudios excluidos del análisis han sido convenientemente catalogados explicitándose los motivos en cada caso de su exclusión.

En cuanto al análisis estadístico, se efectuó como en cualquier Meta-análisis en dos etapas. En una primera parte se realizó la estimación de indicadores para cada estudio, es decir se calculó la S, E, VPP y VPN de cada trabajo individual, y en un segundo paso se procedió a la estimación de los indicadores globales.

Abordar un Meta-análisis sólo es apropiado, tal como se ha expuesto en el apartado de Material y Métodos, si existe homogeneidad metodológica de los estudios incluidos, es decir, si todos ellos han evaluado la misma prueba diagnóstica, el mismo test de referencia como estándar de oro, y sobre una cohorte de pacientes similar. Por ello, aquellos estudios que no reunieron ciertas condiciones de homogeneidad metodológica preestablecidas fueron excluidos del análisis.

Además de la homogeneidad metodológica, se analizó la homogeneidad estadística de los resultados, imprescindible antes de realizar estimaciones conjuntas y agrupación de resultados. Lógicamente, siempre cabe esperar una cierta dispersión en la selección de las muestras atribuible simplemente al azar, sin embargo dado que otros factores pueden incrementar la heterogeneidad estadística, resulta imprescindible en todo Meta-análisis explorar e identificar posibles fuentes de heterogeneidad. Así, en el presente Meta-análisis pudo comprobarse la existencia de heterogeneidad estadística mediante la inspección visual de los "gráficos de bosque" y el cálculo del índice de inconsistencia.

Dado que una fuente característica de heterogeneidad es el llamado "efecto umbral", éste fue la primera causa de variación que se exploró. Tal como se ha expuesto en el apartado de Material y Métodos este efecto surge cuando el umbral o punto de corte seleccionado para definir un resultado como positivo no es el mismo en todos los estudios incluidos. El cálculo de la S y E de un test a partir de los datos de un estudio particular, se ven influidos por el punto de corte particular seleccionado por los autores en dicho estudio (Vamvakas, 1998), de modo que la S y la E están inversamente relacionadas; así, la S de un test incrementa conforme disminuye la E del mismo y viceversa. El "efecto umbral" no resultó ser el responsable máximo de la heterogeneidad estadística de nuestra Revisión Sistemática, y por ello se investigaron otras posibles causas de la misma.

Ante la constatación de la presencia de heterogeneidad estadística en un Meta-análisis, existen básicamente cuatro opciones alternativas para proseguir con el análisis y la interpretación de los resultados:

1. Ignorar la existencia de heterogeneidad empleando para el análisis el modelo de efectos fijos (DerSimonian y Laird, 1986).

2. Evitar la combinación de resultados y la estimación de indicadores conjuntos.

3. Considerar la presencia de heterogeneidad e incorporarla en el análisis utilizando el modelo de efectos aleatorios (DerSimonian y Laird, 1986).

4. Realizar un análisis por subgrupos y una meta-regresión empleando diversas covariables para intentar explicar las diferencias entre estos y la heterogeneidad halladas (Zamora et al., 2006). Mediante esta opción, el Meta-análisis permite determinar en qué medida la precisión diagnóstica del test se ve influenciada por las diversas covariables.

Las técnicas de regresión suponen la manera más eficiente de explicar las variaciones halladas en los resultados de los diversos estudios. Se recomienda un número mínimo de 10 estudios por cada covariable incluida en la meta-regresión, tal como se ha apuntado en el apartado de Material y Métodos (Vamvakas, 1998), por ese motivo se seleccionaron un máximo de cuatro covariables en nuestro caso. La detección de covariables con influencia estadísticamente significativa en la precisión diagnóstica de un test permite la clasificación en subgrupos más homogéneos del *pool* de estudios original, para la realización de análisis secundarios.

El realizar diversos subanálisis independientes sobre grupos poblacionales homogéneos en los que no existe heterogeneidad estadística, conduce además al descubrimiento de nuevas líneas de investigación, ya que detecta diferencias en la precisión diagnóstica del test estrictamente dependientes de aspectos concretos relacionados con el paciente, con la técnica de laboratorio empleada, etc. (Irwig et al., 1994).

La última parte de todo Meta-análisis consiste en la interpretación de los resultados y en la valoración de la medida en que éstos son extrapolables y por tanto útiles para la práctica clínica diaria. Una adecuada selección de la población de estudio sobre la que se realiza el Meta-análisis permitirá a posteriori definir con más facilidad la población diana sobre la que los resultados del mismo serán aplicables. Por ello resulta imprescindible el máximo rigor en el momento de diseñar la estrategia de búsqueda e inclusión de trabajos.

Irwig et al. (Irwig et al., 1994) proponen tres supuestos en los que los resultados de un Meta-análisis pueden ser aplicables a un determinado entorno:

1. Si los sujetos de estudio poseen características idénticas a los sujetos evaluados en el Meta-análisis

2. Si existen diferencias en ciertas características de los sujetos evaluados pero el Meta-análisis permite una estratificación de los sujetos en función de las características y una estimación de la precisión diagnóstica del test en los diversos subgrupos.

3. Si existen diferencias en ciertas características de los sujetos evaluados pero el Meta-análisis demuestra que dichas diferencias no influyen de manera significativa en el rendimiento diagnóstico del test estudiado.

Pero además de valorar la calidad de los trabajos incluidos, de evaluar las diferencias halladas entre ellos y de las posibles causas de las mismas, todo Meta-análisis debe incluir en su última parte la búsqueda de un posible sesgo de publicación y el impacto que éste haya podido tener sobre los resultados obtenidos (Moher y Olkin, 1995).

El sesgo de publicación, tal como se expuso en el apartado de Material y Métodos, consiste en la exclusión sistemática de los estudios con menor tamaño muestral o cuyos resultados son negativos (Egger et al., 1997; Felson, 1992). Easterbrook et al. (Easterbrook y Berlin, 1993; Easterbrook et al., 1991) demuestran una probabilidad casi 4 veces superior de ser publicados para los estudios observacionales con resultados estadísticamente significativos y corroboran estos hallazgos en un análisis multivariante.

Un tipo específico de sesgo de publicación es el llamado "sesgo de lenguaje de Babel" o "sesgo de lengua inglesa" ("*language of Babel bias"* o *"English-language bias")* (Egger et al., 1997; Gregoire et al., 1995) Se produce cuando los trabajos publicados en lengua no inglesa quedan excluidos del análisis. Aunque las diferencias en términos de calidad entre los estudios publicados en inglés y aquellos publicados en otras lenguas son pequeñas, existe una clara tendencia hacia la publicación de los trabajos con resultados estadísticamente significativos en las revistas de lengua inglesa. Por ello, excluir en un Meta-análisis los trabajos no publicados en inglés podría sesgar los resultados del análisis a favor de la significación estadística. A pesar de todo esto, la realidad es que en la mayoría de los Meta-análisis los autores restringen la inclusión de literatura a aquella publicada en inglés por motivos diversos (Gregoire et al., 1995), y así sucedió en nuestro caso.

Por todo lo anteriormente expuesto, la evaluación de la eventual presencia de sesgo de publicación es obligatoria en toda Revisión Sistemática. Sin embargo, esta valoración en los estudios sobre precisión diagnóstica resulta más compleja que en las Revisiones Sistemáticas sobre efectividad de tratamientos (Irwig et al., 1995).

Dado que hasta la fecha no se dispone de herramientas más específicas, los expertos recomiendan investigar la presencia de sesgo de publicación en las Revisiones Sistemáticas

sobre precisión de test diagnósticos con las herramientas clásicas empleadas en otros tipos de Meta-análisis (test de Egger, "gráficos de embudo" etc) aunque la interpretación de los resultados tenga que hacerse de manera más cautelosa (Deeks et al., 2005; Song et al., 2002), y así se realizó en el presente Meta-análisis.

6.2. IHQ *vs* MSP EN EL ANÁLISIS DE MGMT

La importancia del estado de MGMT como potencial factor predictivo de respuesta al tratamiento y/o como factor pronóstico de supervivencia en los pacientes con gliomas de alto grado, ha sido avalada por un número no desdeñable de estudios independientes y así se ha expuesto en el capítulo I de esta tesis.

Durante los últimos años, la MSP ha sido el método más frecuentemente empleado para estudiar el estado de metilación del promotor de *MGMT*, y de hecho, continúa siendo a día de hoy el test de elección. Por este motivo fue considerado como test de referencia en nuestra Revisión Sistemática. Sin embargo, la MSP no ha sido todavía incorporada a la rutina diagnóstica del día a día de la mayoría de los centros y, al mismo tiempo que su empleo se ha extendido a cada vez más laboratorios, otras formas de evaluación de MGMT, como son el análisis de la expresión del ARNm y/o de la proteína, continúan todavía siendo empleados por numerosos grupos (Capper et al., 2008; Preusser, 2009).

El tipo de técnica seleccionada para el estudio de MGMT resulta importante en la medida que la proporción de tumores con promotor metilado, o el grado de expresión de la proteína o del ARNm de MGMT, han resultado ser diferentes en dependencia del método empleado para su análisis (Parkinson et al., 2008).

A la hora de elegir un determinado test biológico para su implantación rutinaria como test diagnóstico en la práctica diaria, es importante tener en cuenta que el método óptimo será aquel que resulte fácilmente disponible en el máximo número de centros, fácil de implementar, rentable desde el punto de vista económico, reproducible tanto dentro del mismo laboratorio como entre distintos laboratorios, y cuyos resultados se asocien de manera sólida con el pronóstico de los pacientes, la quimiosensibilidad tumoral, etc. (Preusser, 2009; Yip et al., 2008).

En este sentido la MSP es una técnica de valoración cualitativa altamente sensible, si bien la IHQ posee algunas ventajas respecto a ella (Nakasu et al., 2004). Ambas son las técnicas más frecuentemente empleadas en el estudio de MGMT.

Aunque algunos grupos han publicado la existencia de una alta concordancia entre los resultados de las mismas, existe evidencia creciente de que el análisis de metilación del promotor de *MGMT* por MSP no se correlaciona de manera sólida con el grado de expresión de la proteína de MGMT evaluada mediante IHQ en los tumores cerebrales (Brell et al., 2005; Grasbon-Frodl et al., 2007; Idbaih et al., 2007; Jeuken et al., 2007; Maxwell et al., 2006). Más aún, algunos estudios han demostrado que el estado de metilación de *MGMT* y la expresión proteica de MGMT no pueden ser considerados de manera indistinta en la valoración pronóstica de los pacientes con gliomas o en la predicción de la eventual quimiosensibilidad tumoral (Everhard et al., 2009; Maxwell et al., 2006).

Los resultados de este Meta-análisis corroboran esta evidencia y sugieren que los pacientes seleccionados mediante el análisis IHQ de expresión de MGMT pueden no corresponder exactamente a los seleccionados mediante la determinación del estado de metilación del promotor por MSP.

De hecho, el rendimiento diagnóstico estimado de la IHQ fue significativamente menor para tumores cerebrales que para tumores no-cerebrales (sistémicos), oscilando la S entre 53 - 64% *vs*. 60 - 81% respectivamente y la E entre 60 - 84% *vs*. 80 - 93% respectivamente. Del mismo modo, las *likelihood ratio* + y - para la IHQ no mostraron una precisión diagnóstica óptima en tumores cerebrales (Tabla II.7.)

Por consiguiente, el tipo de tumor (primario cerebral *vs.* sistémico) resultó ser la covariable independiente con mayor influencia sobre la precisión diagnóstica de la IHQ de entre todas las covariables evaluadas, por encima incluso de otras más relacionadas con aspectos metodológicos como el umbral de positividad seleccionado o el tipo de anticuerpo comercial empleado.

Las razones de estos hallazgos no son conocidas hasta la fecha tal como se ha expuesto ampliamente en el capítulo I, y existen varias cuestiones que deben tenerse en consideración.

En primer lugar, no existe un punto de corte o umbral de positividad perfectamente definido y universalmente aceptado para la evaluación inmunohistoquímica. Capper et al. (Capper et al., 2008) proponen un 15% de celularidad positiva como umbral para glioblastomas y un 35% para el glioma de bajo grado. Nakasu et al. (Nakasu et al., 2004) establecen el punto de corte en 10-20%, y Preusser et al. (Preusser et al., 2008) hallan una concordancia óptima entre MSP e IHQ, estableciendo el 50% de células positivas como umbral de corte.

Sin embargo, atribuir de manera exclusiva la falta de concordancia entre los resultados de ambas técnicas al umbral de positividad seleccionado para la IHQ resulta discutible, ya que en éste no resultó ser covariable independiente de precisión diagnóstica en el análisis de meta-

regresión, mientras que el tipo de tumor (cerebral *vs*. sistémico) se asoció de manera estadísticamente significativa al rendimiento diagnóstico de la IHQ (Tablas II.8. y II.9.).

Además del punto de corte, otro aspecto técnico de la IHQ a considerar es la posibilidad de que se produzcan ciertas variaciones ínter-observador a la hora de discriminar entre células positivas y negativas o entre inmunotinción real, específica y fondo de la preparación (Preusser et al., 2008). Es decir, incluso en aquellos casos en los que se ha empleado el mismo umbral para considerar un tumor como inmunopositivo para la expresión de MGMT, el hecho de que la interpretación del test requiera la valoración de un patólogo implica cierto componente de subjetividad, y por ello un cierto "efecto umbral implícito" (Irwig et al., 1994).

Por otro lado, y tal como queda reflejado en las Tablas II.4. y II.5., no todos los grupos realizan análisis histológico de la zona tumoral de la que se extraerá ADN para el análisis de MGMT. Cuando la zona del tumor empleada para evaluar el estado de metilación del promotor mediante MSP, es diferente a la estudiada mediante IHQ, la presencia de necrosis y/o tejido normal en grandes cantidades puede artefactar el resultado de la MSP.

Además, la MSP es altamente sensible por lo que en ocasiones puede observarse amplificación de la banda de metilación en tumores con una proporción de células con promotor metilado realmente minoritaria (Bae et al., 2002).

Hoy conocemos que existen distintos patrones de metilación del promotor de *MGMT* en función de las islas CpG de la región que se encuentren metiladas. A su vez, algunas de las islas CpG pueden ser más importantes que otras en relación a la transcripción del gen y por lo tanto, la metilación en todas ellas no tiene necesariamente que desembocar en el mismo efecto sobre la expresión final de MGMT y su función. De hecho algunos autores han apuntado la posibilidad de que la región evaluada normalmente mediante la MSP pueda no ser la máxima responsable de la transcripción del gen y por ello de la expresión de la proteína (Everhard et al., 2009), justificando así la falta de correlación entre los resultados de ambos métodos.

La IHQ por el contrario posee menor sensibilidad y puede no detectar pequeños grupos celulares con expresión de MGMT (Kohonen-Corish et al., 2005).

Aparte de estas cuestiones puramente metodológicas, la regulación de la expresión de MGMT en los tumores cerebrales es un fenómeno complejo y ha sido objeto de la discusión del capitulo I. Tal como se expone en ese capítulo, la hipermetilación del promotor de *MGMT*, puede no ser el único factor determinante de la expresión proteica (Bae et al., 2002; Bhakat y Mitra, 2003; Park et al., 2001; Rood et al., 2004; Smith-Sorensen et al., 2002).

Del mismo modo que sucede con determinados acontecimientos genéticos o cromosómicos, los cambios epigenéticos pueden también ser tejido-específicos o incluso tumor-

específicos (Esteller et al., 2001; Lorente et al., 2009), lo que podría explicar por qué existe mejor concordancia entre el estado de metilación del promotor y la expresión de la proteína en los tumores no cerebrales. De hecho, la falta de correlación consistente entre metilación del promotor y expresión proteica, no se limita en los gliomas al gen *MGMT*, sino que ha sido también observada en otros genes como *PTEN* (Baeza et al., 2003).

Una particularidad bien conocida de los gliomas es que son tumores heterogéneos tanto desde el punto de vista histológico como genético (Harada et al., 1998; Ren et al., 2007; Walker et al., 2003). En los últimos años, la posible existencia de heterogeneidad en el estado de metilación de *MGMT* y en la expresión de la proteína MGMT, ha sido objeto de investigación y de diversas publicaciones, con resultados algo contradictorios al respecto.

Y así, mientras que la heterogeneidad intratumoral en la expresión inmunohistoquímica de MGMT es un hecho bien conocido y aceptado, la posible heterogeneidad en el estado de metilación del promotor de *MGMT*, es algo más controvertido. Algunos autores como Grasbon-Frodl et al. (Grasbon-Frodl et al., 2007) y Iafrate et al. (Iafrate y Louis, 2008) apuntan incluso la posibilidad de que se produzcan variaciones en el estado de metilación de un mismo tumor a lo largo del tiempo, si bien la trascendencia real de estas modificaciones es desconocida hasta el momento.

Otro detalle que pudiera explicar la falta de asociación entre los resultados de la IHQ y de la MSP, es, tal como se ha expuesto más extensamente en el capítulo I, la posibilidad de que en algunos gliomas exista una metilación monoalélica, de modo que permaneciendo un alelo no-metilado se produzca transcripción del gen y por lo tanto expresión de la proteína a partir del mismo, al tiempo que mediante MSP podría detectarse metilación en el promotor del otro alelo (Parkinson et al., 2008).

Por último hay que recordar que el gen *MGMT* se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 (*10q*), región que se encuentra deleccionada en la mayoría de los glioblastomas (en 70% de los glioblastomas primarios y en 63% de los secundarios (Louis et al., 2007)), y en el 35-60% de los astrocitomas anaplásicos (Ichimura et al., 1998). Ello implica por lo tanto, que incluso en aquellos gliomas malignos sin metilación del promotor, podría existir una haploinsuficiencia independiente de factores epigenéticos (Iafrate y Louis, 2008).

En el intento de subsanar gran parte de los problemas metodológicos previamente mencionados, durante los últimos años algunos grupos han desarrollado métodos de evaluación para MGMT cuantitativa o semicuantitativa. Entre ellos algunos de los más destacados son la llamada MSP cuantitativa *MethylLight*®, la pirosecuenciación, la llamada COBRA, etc.

(Baumann et al., 2006; Grasbon-Frodl et al., 2007; Nagasaka et al., 2008; Parkinson et al., 2008a; Uccella et al., 2009; Wu et al., 2010).

Hasta la fecha, ninguno de estos métodos ha sido validado ni estandarizado en una cohorte amplia de pacientes y ninguno de ellos ha demostrado una clara superioridad en términos diagnósticos frente a la MSP clásica (Karayan-Tapon et al., 2009).

Si bien es cierto que las nuevas técnicas de valoración cuantitativa parecen ser algo más discriminativas que la MSP clásica, ninguna de éstas proporciona una medida de valor absoluta y real. Además, como limitación técnica de las mismas cabe destacar que la presencia de tejido no tumoral contaminando la muestra puede provocar una infravaloración del grado de metilación, ya que estas técnicas se basan en la determinación del número de copias de un gen control o de la secuencia de no-metilación del promotor para la normalización de la expresión génica (Weller et al., 2010), y por lo tanto, la presencia de cierta cantidad de ADN no tumoral puede condicionar sus resultados.

6.3. LIMITACIONES DE LA PRESENTE REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS

La presente Revisión Sistemática y Meta-análisis poseen algunas limitaciones. En primer lugar, la calidad de cualquier Meta-análisis viene en gran medida determinada por la calidad de los trabajos incluidos en el mismo (Ortiz, 2005). En el presente Meta-análisis se excluyeron 17 estudios en los que no se proporcionaba suficiente información para la construcción de la tabla de contingencia de 2x2, y ello ha podido influir en los resultados obtenidos.

En segundo lugar, la potencia estadística del Meta-análisis se encuentra limitada por el relativo pequeño tamaño muestral de la mayoría de los estudios incluidos.

En tercer lugar, la herramienta de valoración de calidad QUADAS ha revelado que en aproximadamente dos terceras partes de los estudios incluidos pudiera existir un cierto sesgo de verificación parcial debido a que en ellos, no todos los casos analizados mediante IHQ fueron verificados mediante MSP.

Otro aspecto importante a considerar en lo referente a la calidad metodológica de los trabajos incluidos es que la interpretación de los resultados del test de referencia debería siempre efectuarse, en condiciones óptimas, a ciegas de los resultados del test problema y viceversa (Deeks, 2001). Desafortunadamente, en el 84% de los trabajos incluidos en el presente

Meta-análisis, los autores no especifican los detalles en lo que se refiere a interpretación de la IHQ, y en 73% de los estudios sucede lo mismo en relación a los resultados de la MSP.

Por último la inspección del "gráfico de embudo" y los resultados del test de regresión de Egger han demostrado la presencia de sesgo de publicación. La exclusión de los trabajos de lengua no inglesa podría explicar en parte este sesgo, tal como se expuso previamente, si bien la predominancia en la literatura de estudios con resultados positivos resulta una explicación más plausible (Egger et al., 1997).

En términos generales, las Revisiones Sistemáticas de máxima calidad poseen en sí mismo la limitación de proporcionar únicamente respuesta a una pregunta concreta (Merlin et al., 2009).

6.4. POTENCIAL IMPACTO DE LA PRESENTE REVISIÓN SISTEMÁTICA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

La toma de una decisión siempre está acompañada de cierto grado de incertidumbre. Tanto la intuición como la experiencia clínica fueron durante mucho tiempo los elementos que los investigadores aplicaban para contrarrestar el incierto (Ortiz, 2005). Actualmente existe un permanente reconocimiento de la necesidad de contar con información recolectada de modo sistemático, para que sea válida y útil a las necesidades del investigador y del clínico en a la toma de decisiones.

Debido a que los recursos siempre serán limitados, las Revisiones Sistemáticas son una pieza fundamental para tomar decisiones sanitarias que deben mantenerse actualizadas a fin de incorporar nuevas evidencias.

Mediante la presente Revisión Sistemática y Meta-análisis ha quedado demostrado de manera sólida lo que sugerían numerosos estudios publicados a lo largo de la última década. No existe una buena concordancia entre el estado de metilación del promotor de *MGMT* determinado por MSP, y la expresión proteica de la misma valorada mediante IHQ. Determinar si las causas de esta discordancia son puramente metodológicas o si obedecen a razones más profundas en relación a la regulación genética de *MGMT*, queda fuera del objetivo del Meta-análisis habiéndose tratado de manera exhaustiva en el capítulo I.

Desde un punto de vista práctico, lo que si parece evidente, es que especialmente en los tumores cerebrales ambas técnicas no son intercambiables, y por lo tanto, el valor pronóstico o

predictivo del estado de metilación del promotor de *MGMT* puede no reflejar el impacto pronóstico o predictivo de la expresión proteica.

Ello deberá tenerse en cuenta en el diseño de ensayos clínicos con estratificación de los pacientes de acuerdo al estado de MGMT, no debiendo incluir ambas técnicas o, en su defecto, analizando por separado los resultados de cada una de ellas, puesto que éstos no son comparables.

A pesar de su sencillez y menor coste económico, la IHQ adolece de ciertos problemas ampliamente discutidos en el presente capítulo que desaconsejan, desde nuestro punto de vista, su incorporación como prueba rutinaria para el estudio de MGMT en la asistencia clínica diaria.

Los esfuerzos en investigación en los próximos años deberían dirigirse, a nuestro juicio, hacia un mayor desarrollo y perfeccionamiento de la MSP o de cualquiera de sus variantes, haciéndola más sencilla, más reproducible y probablemente también trasformándola en un método de valoración cuantitativo o semicuantitativo.

7. CONCLUSIONES

Las Revisiones Sistemáticas de la literatura y los Meta-análisis sobre precisión de test diagnósticos son herramientas extremadamente útiles en investigación, y por ello cada vez más empleadas en la evaluación de métodos diagnósticos. La metodología necesaria para efectuar este tipo de investigación ha experimentado un importante desarrollo en los últimos años, sin embargo, se plantean todavía dos retos. En primer lugar la limitación que supone en ocasiones la falta de estudios de calidad realizados sobre muestras grandes y, en segundo lugar, se requiere aún de un mayor avance en lo que se refiere a la interpretación y presentación de los resultados para que resulten fácilmente comprensibles y útiles a los clínicos.

Los resultados de la presente Revisión Sistemática y Meta-análisis muestran que no existe buena concordancia entre la expresión proteica de MGMT valorada mediante IHQ y el estado de metilación del promotor de *MGMT* valorada mediante MSP. La ausencia de correlación entre los test parece ser mayor para los tumores cerebrales, independientemente del punto de corte como umbral de inmunopositividad seleccionado en el estudio.

Por todo ello, nuestros resultados parecen confirmar la hipótesis de que el grado de expresión de la proteína MGMT no siempre refleja el estado de metilación del promotor de *MGMT,* y del mismo modo, el estado de metilación del promotor de *MGMT* no siempre refleja el grado de expresión genética.

Concluimos por lo tanto que ambos métodos diagnósticos no son intercambiables y no deben emplearse indistintamente en la práctica clínica diaria, ya que no seleccionan el mismo subgrupo de pacientes. Estos datos resultan de crucial importancia en los estudios clínicos en los que se efectúa una estratificación de los pacientes en función del estado de MGMT.

Capítulo III

IMPLICACIÓN DEL PATRÓN RADIOLÓGICO EN EL PRONÓSTICO DE LOS TUMORES OLIGODENDROGLIALES

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los tumores oligodendrogliales, tanto puros como mixtos (oligoastrocitarios), son gliomas clásicamente considerados como de mejor pronóstico que los astrocitomas (Huang et al., 2009). En la actualidad, la clasificación histopatológica de estos tumores sigue basándose exclusivamente en criterios morfológicos y resulta compleja especialmente en el caso de los oligoastrocitomas (Blesa et al., 2009; Jeuken et al., 2001). La falta de un marcador inmunohistoquímico específico dificulta el diagnóstico y provoca que, debido a cierto componente de subjetividad por parte del neuropatólogo, exista variabilidad en la incidencia de estos tumores de institución a institución (Walker et al., 2005).

La clasificación histológica es además, claramente insuficiente para predecir la respuesta tumoral al tratamiento estándar actual y a las nuevas terapias basadas en dianas moleculares (Nutt, 2005) por lo que la investigación de marcadores moleculares resulta imprescindible (Kim et al., 2010).

Desde el punto de vista radiológico, los tumores oligodendrogliales se originan preferentemente en el córtex o en la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales, y fundamentalmente en el lóbulo frontal hasta en un 50-65% de los casos. Los lóbulos temporal, parietal y occipital así como las estructuras troncoencefálicas o de la fosa posterior suelen verse menos implicadas en este tipo de lesiones. Los oligodendrogliomas son los tumores intracraneales que con mayor frecuencia presentan calcificaciones (60-90% de los casos) (Choi et al., 2010). Aproximadamente la mitad presentan algún tipo de captación de contraste, siendo la captación anular infrecuente en ellos, y cuando aparece, marcador de mal pronóstico (Cairncross et al., 1998; El-Hateer et al., 2009).

La mayoría de los oligodendrogliomas y un alto porcentaje de los oligoastrocitomas presentan como marca de identidad genética la pérdida de heterocigosidad de *1p19q* (LOH*1p19q)* (Kraus et al., 1995; Reifenberger et al., 2007). Es precisamente la presencia de esta co-delección lo que parece conferir a estos tumores mayor quimiosensibilidad y mejor pronóstico en relación a otros gliomas (Kros et al., 2007; Reifenberger et al., 2007; von Deimling et al., 2007). Sin embargo, el papel de la genética molecular en el manejo clínico rutinario de los pacientes no está todavía firmemente establecido (Walker et al., 2006).

La investigación dirigida a evaluar la influencia pronóstica de determinados aspectos radiológicos, ha despertado un gran interés en los últimos años (Walker et al., 2005). En concreto, la identificación de características radiológicas que se asocien a LOH*1p19q* y, por tanto, que permitan predecir el comportamiento biológico de los tumores, constituye una de las líneas de trabajo desarrolladas en este sentido. Así, la nitidez de los límites tumorales en la RM preoperatoria, la mayor o menor heterogeneidad de señal, la presencia de susceptibilidad paramagnética, la localización del tumor en el cerebro, el patrón espectroscópico o la variabilidad en las secuencias de perfusión (Eoli et al., 2006; Laigle-Donadey et al., 2004; McDonald et al., 2005; Megyesi et al., 2004; Mueller et al., 2002; Zlatescu et al., 2001; Whitmore et al., 2007) han sido algunos de los factores analizados en la última década, y que han demostrado en algunas series asociación estadísticamente significativa con el perfil genético de los tumores.

El fundamento científico sobre el que se sustenta esta relación genético-radiológica es el hecho de que la co-delección *1p19q,* que es un evento precoz en la génesis de los gliomas oligodendrogliales, podría conferir a aquellos tumores que la presentan, una menor capacidad invasiva e infiltrativa, condicionando a su vez el aspecto radiológico de la lesión, su localización y extensión en el cerebro, etc. (Jenkinson et al., 2006).

En este sentido, se definen clásicamente para los gliomas tres patrones radiológicos de crecimiento: patrón sólido, infiltrativo y mixto (Daumas-Duport et al., 1997; Kelly et al., 1987). Algunos autores señalan la posibilidad de que estos patrones de crecimiento clásicos obedezcan en realidad a diferentes perfiles genéticos, existiendo una tendencia de los tumores con alelos intactos hacia un crecimiento más infiltrativo y de aquellos con pérdida de heterocigosidad hacia un patrón de crecimiento más sólido.

La identificación de aspectos clínicos o de características radiológicas que se asocien a la presencia de co-delección *1p19q*, y que por tanto se comporten como factores subrogados de ésta (Kim et al., 2010), puede resultar de enorme utilidad en la práctica clínica diaria por varios motivos.

En primer lugar, y a diferencia de las pruebas de laboratorio requeridas para el análisis molecular, las pruebas radiológicas se realizan de manera rutinaria en el estudio preoperatorio de todos los pacientes y por ser no invasivas, pueden repetirse cuantas veces sea necesario a lo largo de la evolución del paciente (Kapoor et al., 2009).

Además, en la actualidad muchos centros de nuestro entorno carecen de la posibilidad de realizar los estudios moleculares ya que además de consumir tiempo y recursos económicos, precisan de infraestructura adecuada y personal entrenado.

En tercer lugar, dado el impacto pronóstico y el valor predictivo de respuesta a la quimioterapia de LOH*1p19q,* el examen de las características radiológicas asociadas a ésta podría resultar de ayuda en la valoración pronóstica de los pacientes e incluso, en función de la solidez de la asociación, en la toma de decisiones respecto a la terapéutica.

Por último, tal como señala Cairncross et al. (Cairncross, 2004), el estudio de la relación entre las características radiológicas y el perfil genético de los tumores oligodendrogliales permitirá profundizar en el conocimiento de la génesis y progresión de éstos.

Sin embargo, la literatura publicada hasta la fecha a este respecto es limitada y controvertida. La mayoría de los estudios han sido realizados de manera retrospectiva, de acuerdo a la clasificación de la OMS previa a la actualmente vigente, e incluyendo casos pertenecientes a intervalos de tiempo tan amplios que los pacientes han recibido esquemas terapéuticos muy distintos por lo que el análisis de factores pronósticos resulta poco veraz.

En este capítulo se analiza una serie homogénea de pacientes tratados de acuerdo a un protocolo diagnóstico y terapéutico preestablecido común, y cuyas lesiones fueron clasificadas por dos neuropatólogos independientes, siguiendo la última actualización de la clasificación de la OMS (Louis et al., 2007).

2. HIPÓTESIS

Hipótesis conceptual: Considerando el valor pronóstico de LOH*1p19q* y la asociación entre el perfil molecular y determinados aspectos radiológicos de los tumores oligodendrogliales, el examen de estas características radiológicas concretas podría predecir el pronóstico de los pacientes.

Hipótesis de trabajo: El análisis de determinadas características radiológicas de la RM preoperatoria en los pacientes con diagnóstico de glioma con componente oligodendroglial permitirá clasificar a los pacientes en subgrupos con un pronóstico más homogéneo.

3. OBJETIVOS

Objetivo General: Confirmar la existencia de heterogeneidad regional de los parámetros moleculares en una serie de gliomas con componente oligodendroglial y valorar la asociación entre el perfil genético de estos tumores y determinadas características radiológicas.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar la correlación entre la presencia de LOH*1p*, LOH*19q* y co-delección *1p19q* con determinadas características radiológicas del estudio de RM preoperatorio.

2. Evaluar la correlación entre la presencia de LOH*1p*, LOH*19q* y co-delección *1p19q* con determinadas variables clínicas.

3. Analizar la correlación entre las variables clínico/radiológicas y las alteraciones moleculares en el subgrupo de pacientes con oligoastrocitomas.

4. Analizar la influencia pronóstica en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión de LOH*1p*, LOH*19q* y co-delección *1p19q* en toda la serie y en el subgrupo de pacientes con oligoastrocitomas.

5. Analizar el valor pronóstico en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión de las variables radiológicas, clínicas y moleculares analizadas en toda la serie y en el subgrupo de pacientes con oligoastrocitomas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. RECOGIDA DE MUESTRAS Y SELECCIÓN DE PACIENTES

Se incluyeron 54 pacientes con diagnóstico de oligodendroglioma u oligoastrocitoma grado II o III de la OMS (Louis et al., 2007) intervenidos en el Hospital Universitario de Bellvitge y Hospital Clínic de Barcelona, de los que se disponía de las imágenes de RM preoperatorias y de los datos moleculares de LOH*1p19q*. Las muestras tumorales se recogieron durante la intervención quirúrgica y fueron parafinadas para el estudio histológico. En aquellos casos con excedente de material, las muestras se congelaron y almacenaron a -80ºC.

En todos los casos se efectuó una revisión histológica del material en el momento del estudio por dos neuropatólogos independientes, de acuerdo a clasificación de la OMS actualmente vigente (Louis et al., 2007). Se consideraron como tumores mixtos aquellos que contenían componente astrocitario y oligodendroglial en áreas geográficamente distintas. La cantidad mínima de componente oligodendroglial requerido para considerar el tumor como oligoastrocitoma fue del 25%. El estudio fue aprobado por el Comité de Etica Asistencial y todos los pacientes dieron su consentimiento informado para participar en el estudio.

En todos los pacientes se aplicó un protocolo preestablecido y común de diagnóstico y tratamiento, que incluía tratamiento quirúrgico en primera instancia, con el objetivo de alcanzar la máxima resección segura, seguido de tratamiento radio y quimioterápico tras la intervención para los gliomas grado III, y de radioterapia adyuvante para los grado II con resecciones quirúrgicas incompletas o en la recidiva/progresión. La radioterapia consistió en irradiación focal sobre el lecho de asentamiento tumoral mas 2-3cm de margen alrededor del volumen tumoral. Se empleó un sistema de inmovilización rígido estándar para administrar una dosis total de 50-54Gy para los grado II y de 60Gy para los tumores anaplásicos, en fracciones diarias estándar de 2Gy. La quimioterapia consistió en la administración de carmustina [1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea] (BCNU) a dosis de 200 mg/m2 cada 8 semanas durante 6 ciclos, o PCV (procarbacina, CCNU y vincristina) a dosis de (procarbazina 60 mg/m^2 los días 8-21, CCNU 110 mg/m^2 el día 1, y vincristine 1.4 mg/m^2 los días 8 y 29 cada 6 semanas durante 6 ciclos).

Aquellos pacientes con deterioro del estado general severo o mala situación funcional no recibieron tratamiento complementario. Del mismo modo, fueron excluidos del tratamiento quimioterápico aquellos pacientes que presentaron progresión de la enfermedad durante la radioterapia. La respuesta tumoral al tratamiento fue evaluada mediante RM y de acuerdo a los criterios de Mcdonald (Macdonald et al., 1990) (Anexo II).

4.2. ANÁLISIS RADIOLÓGICO

Se analizaron las secuencias potenciadas en T1 con y sin gadolinio, y las secuencias potenciadas en T2 del estudio de RM preoperatorio efectuado a todos los pacientes. La evaluación se realizó de manera independiente por dos neurorradiólogos, que carecían de información concerniente al estudio molecular de los correspondientes tumores y a los datos clínicos y de supervivencia de los pacientes.

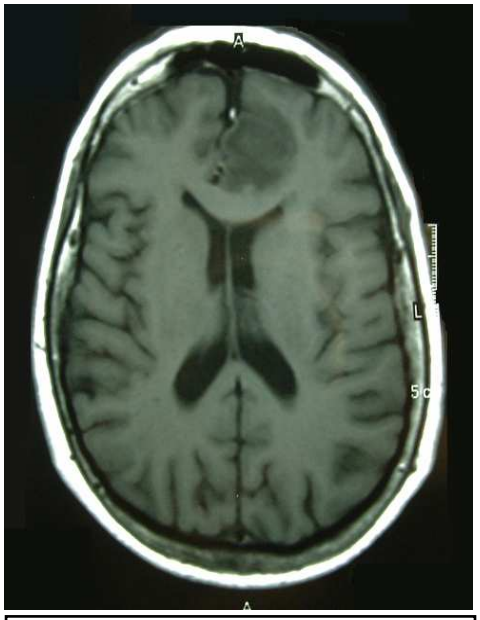
Se realizó el examen radiológico de acuerdo a la metodología publicada previamente (Megyesi et al., 2004) de las siguientes características (Figura III.1.):

1. Aspecto invasivo con límites mal definidos *vs* límites bien definidos en secuencias potenciadas en T1. Se consideró para ello la nitidez del borde tumoral en todo o la mayor parte de su perímetro
2. Señal homogénea *vs* heterogénea en secuencias potenciadas en T2.
3. Presencia *vs* ausencia de captación de contraste paramagnético.
4. Presencia *vs* ausencia de necrosis radiológica.
5. Localización del tumor de acuerdo a la metodología previamente publicada en la literatura (Zlatescu et al., 2001). Se consideró como localización del tumor aquel lóbulo o región en el que residía la mayor parte de la masa tumoral. Aquellos tumores que se extendían hacia varios lóbulos o regiones cerebrales adyacentes, fueron considerados como multilobares, mientras que aquellos tumores que se extendían hacia el hemisferio contralateral a través de las estructuras de línea media se clasificaron como bilaterales. Para el análisis estadístico esta variable se simplificó en localización frontal *vs* no frontal y localización temporal (que incluía en lóbulo temporal con o sin extensión a otro lóbulo cerebral y la ínsula) *vs* no temporal.

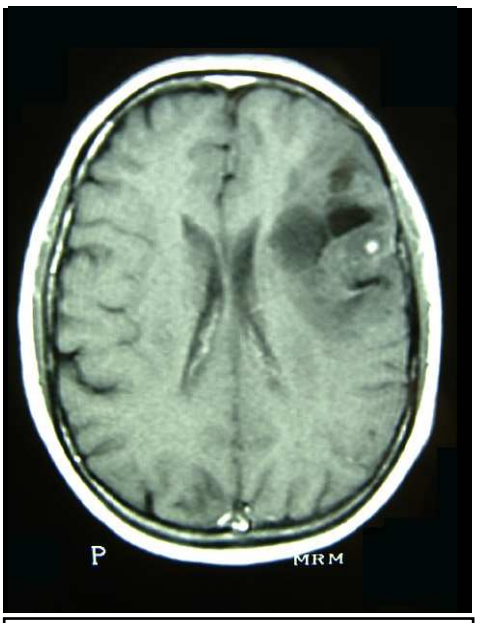
Figura III.1.: Características radiológicas analizadas

Borde regular, límites definidos

Borde irregular, límites mal definidos

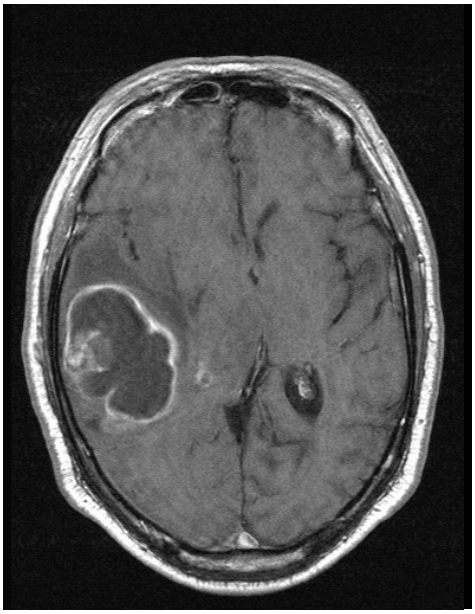


Señal homogénea



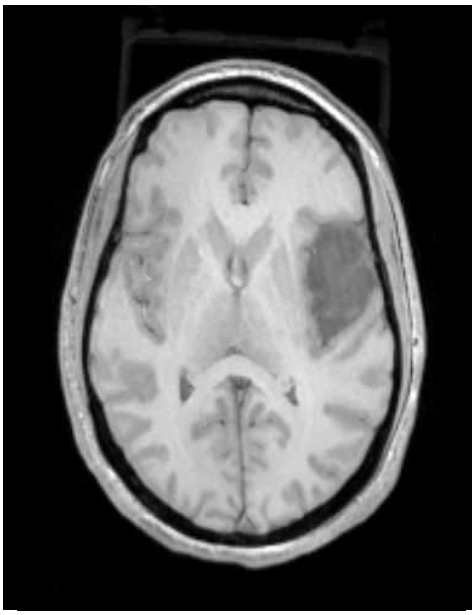
Señal heterogénea

Captación sólida de contraste



Captación anular, necrosis radiológica

Localización frontal



Localización no frontal

4.3. ESTUDIO MOLECULAR

El ADN tumoral se obtuvo de las muestras parafinadas o congeladas en función de la disponibilidad y de acuerdo a protocolos previamente publicados (Brell et al., 2005). El ADN genómico fue obtenido a partir de linfocitos de sangre periférica con la ayuda del kit comercial *QAmp 96 DNA Blood Kit* (Qiagen, Alemania).

El estado de *1p* y *19q* fue analizado mediante el estudio de pérdida de heterocigosidad (LOH) en muestras pareadas de ADN tumoral y genómico utilizando marcadores de microsatélite en 1p36 (D1S2734, D1S199, D1S508) y 19q13 (D19S219, D19S112, D19S412, D19S596). Las condiciones de amplificación y la secuencia de los cebadores fueron obtenidas de la base de datos *Genome Database* (www.gdb.org). Los productos obtenidos de la reacción de PCR fueron analizados con el analizador *Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer*, y el patrón de los alelos con el software *GeneMapper 3.0* (AppliedBiosystems)

4.4. VARIABLES CLÍNICAS

Se recogieron como variables clínicas la sintomatología de presentación de la enfermedad (epilepsia, focalidad, deterioro cognitivo, cefalea y sintomatología de hipertensión intracraneal), y el tipo de cirugía efectuado (biopsia, resección parcial o resección completa) (van den Bent et al., 2003).

4.5. ANALISIS ESTADÍSTICO

El análisis de la asociación entre las características radiológicas/clínicas y moleculares se efectuó mediante la prueba $\chi 2$ (Ji-cuadrado) y el test exacto de Fisher. Para el análisis estadístico la localización del tumor se dicotomizó en frontal *vs* no frontal y temporal *vs* no temporal, de acuerdo a lo publicado en estudios previos (Laigle-Donadey et al., 2004; Zlatescu et al., 2001). Se empleó el estadístico kappa para evaluar el grado de asociación entre variables cualitativas estadísticamente relacionadas.

La supervivencia global fue calculada desde la fecha de la intervención quirúrgica hasta el momento del éxitus o la fecha de la última visita. Del mismo modo, la supervivencia libre de progresión fue calculada desde la fecha de la intervención quirúrgica hasta la fecha de la

recidiva/progresión. Las curvas de supervivencia fueron elaboradas de acuerdo al método de Kaplan-Meier y comparadas mediante los test de Log-rank y Breslow. Las variables con un nivel de significación $P \leq 0.1$ en el análisis univariante, fueron seleccionadas para su inclusión en el análisis multivariante según el modelo de riesgos proporcionales de Cox para identificar factores pronósticos independientes.

El análisis de los resultados se efectuó mediante el paquete estadístico SPSS Inc. para Windows versión 11.0 (SPSS,Inc., Chicago, IL, EUA y a un nivel de significación de $P=0.05$.

5. RESULTADOS

Se incluyeron 54 pacientes con diagnóstico confirmado y consensuado de tumor oligodendroglial grado II o grado III de la OMS. Diez casos fueron oligodendrogliomas grado II, 18 oligodendrogliomas anaplásicos, 6 oligoastrocitomas grado II y 20 oligoastrocitomas anaplásicos. Veintiséis pacientes (48.1%) eran hombres y 28 (51.9%) mujeres. La mediana de edad de los pacientes fue de 47 años con un rango de 21-78 años. Se dispuso de material para estudio molecular en 53 casos (98.1%), y de seguimiento clínico en el 100% de los pacientes. La mediana de seguimiento fue de 76.1m (rango, 20.2-168.5). Las principales características clínicas, radiológicas y moleculares se muestran en la Tabla III.1.

Desde el punto vista clínico, la forma de presentación más frecuente fue la epilepsia en el 57.4% de los pacientes, seguida de algún tipo de focalidad neurológica en el 38.9%. La cefalea y el deterioro cognitivo fueron síntomas de debut menos frecuentes en nuestra serie.

En el estudio radiológico, la mayoría de los tumores (68.5%) mostraron realce tras la administración de contraste. Con respecto a la localización, 34 tumores (63%) se localizaron en el lóbulo frontal, mientras que 14 (25.9%) se localizaron en el lóbulo temporal, en la ínsula o en el lóbulo temporal con extensión a estructuras adyacentes. El resto de los tumores no afectaron a ninguno de los dos lóbulos de referencia.

Tabla III.1.: Características radiológicas, clínicas y moleculares de los pacientes incluidos en el estudio

Características radiológicas	**n (%)**
Aspecto invasivo en T1	25 (46.3)
Señal homogénea en T2	14 (25.9)
Captación de contraste	37 (68.5)
Necrosis radiológica	13 (24.5)
Localización frontal	34 (63)
Localización temporal	14 (25.9)
Características moleculares	**n (%)**
LOH *1p*	
Si	33 (62.3)
No	16 (30.2)
No informativo	4 (7.5)
LOH *19q*	
Si	35 (66)
No	13 (24.5)
No informativo	5 (9.4)
LOH *1p19q*	
Si	31 (57.4)
No	19 (35.2)
No informativo	4 (7.4)
Alelos intactos	
Si	12 (22.6)
No	41 (77.4)
Características clínicas	**n (%)**
Epilepsia	31 (57.4)
Focalidad	21 (38.9)
Deterioro cognitivo	11 (20.4)
Cefalea	13 (24.1)
Signos clínicos de hipertensión intracraneal	8 (14.8)

En 16 pacientes (29.6%) se realizó una resección completa, mientras que en 38 (70.4%) sólo pudo efectuarse una resección parcial o una biopsia (en 31 resección parcial y en 7 biopsia). La localización topográfica del tumor en el encéfalo no mostró asociación estadística con el grado de resección (P=0.56). La mediana del KPS postoperatorio fue de 80 (rango 50-100).

En 16 pacientes (29.6%) el diagnóstico anatomopatológico fue de glioma grado II de la OMS (10 oligodendroglioma y 6 oligoastrocitoma), mientras que en 38 (70.4%) el resultado histológico fue de glioma grado III (18 oligodendroglioma y 20 oligoastrocitoma).

Tres pacientes con diagnóstico de glioma anaplásico (7.8%) no recibieron tratamiento radioterápico tras la intervención quirúrgica, dos de ellos por haber recibido radioterapia previamente y otro por presentar deterioro severo del estado general. Seis de estos paciente con gliomas grado III (15.7%) no recibieron quimioterapia complementaria por poseer antecedentes patológicos que lo contraindicaban en un caso, y situación funcional precaria con baja puntuación en la escala de Karnofsky en el resto.

En lo que respecta a los pacientes con tumores de bajo grado, siete (43.7%) recibieron radioterapia adyuvante, cuatro de ellos por tratarse de resecciones incompletas y tres por tratarse de recidiva o progresión de gliomas de bajo grado previos. Un paciente con diagnóstico de oligoastrocitoma de bajo grado recibió tratamiento quimioterápico por presentar progresión durante el seguimiento.

En cuanto a las características genéticas, y tal como se muestra en la Tabla III.1., nuestra serie es genotípicamente similar a las series publicadas en la literatura (Ino et al., 2001). Se dispuso de material histológico para el análisis cromosómico en 53 casos (98.1%), hallándose delección de *1p* en 33 tumores (62.3%), de *19q* en 35 tumores (66%), y co-delección de *1p19q* en 31 casos (51.4%). Se observó la presencia de ambos alelos intactos en 12 tumores (22.6%). Ambas delecciones se mostraron fuertemente asociadas (P<0.0001), de modo que 31 (96.8%) de los 32 tumores que presentaban LOH*1p* también presentaban LOH*19q,* y a la inversa 31 (88.5%) de los 35 tumores que presentaban LOH*19q*, demostraron LOH*1p* concomitante.

En un segundo análisis por subtipo histológico se observaron diferencias en la frecuencia de las delecciones en función de la histología oligodendroglial pura u mixta oligoastrocitaria, sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Así, LOH*1p* fue hallado en el 76% de los tumores oligodendrogliales puros y en el 58.3% de los tumores mixtos (P=0.18), LOH*19q* en el 79.1% de los oligodendrogliomas y en el 66.6% de los oligoastrocitomas (P=0.33), mientras que se detectó LOH*1p19q* en el 68% de los tumores puros y en el 58.3% de los mixtos (P=0.48).

No se observaron tampoco diferencias estadísticamente significativas en la proporción de tumores con LOH*1p,* LOH*19q* o LOH*1p19q*, en función del grado histológico. Así, LOH*1p* se detectó en el 73.3% de los tumores de bajo grado y en el 64.7% de los anaplásicos (P=0.74), LOH*19q* en el 68.7% de los tumores de bajo grado y en el 75% de los anaplásicos (P=0.73), y LOH*1p19q* en el 62.5% de los tumores de bajo grado frente al 63.6% de los anaplásicos (P=0.93).

El análisis de la asociación entre las características radiológicas y moleculares mostró la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre localización frontal del tumor y la presencia de LOH*1p* (P=0.004), LOH*19q* (P=0.006), y LOH*1p19q* (P=0.007) (Tabla III.2.). Así mismo, se halló una relación estadísticamente significativa entre la presencia de necrosis radiológica y la co-delección *1p19q* (P=0.02), tanto en la serie global como en el subgrupo de pacientes con tumores anaplásicos (P=0.04). Sin embargo, el análisis de la asociación entre la presencia de necrosis radiológica y cada una de las delecciones de manera independiente, sólo mostró una tendencia sin llegar a la significación estadística (P=0.06 para LOH*1p*, y P=0.09 para LOH*19q*).

La fuerza de esta asociación descrita entre localización y el perfil genético se mantuvo, e incluso incrementó su significación estadística en el subanálisis realizado sobre el grupo de tumores mixtos, (localización frontal y LOH*1p* (P=0.006); localización frontal y LOH*19q* (P=0.001); localización frontal y LOH*1p19q* (P=0.006)). No se hallaron delecciones cromosómicas en los tumores mixtos de localización temporal o insular. Asimismo, en el subgrupo de tumores anaplásicos se observó una asociación estadísticamente significativa entre la localización anatómica y el perfil genético (localización frontal y LOH*1p* (P=0.02); localización frontal y LOH*19q* (P=0.002); localización frontal y LOH*1p19q* (P=0.02)).

No encontramos en nuestra serie ninguna asociación estadísticamente significativa entre las características moleculares de los tumores y el resto de los aspectos radiológicos analizados (Tabla III.2).

Tabla III.2. Correlación entre las características radiológicas analizadas y el perfil genético tumoral

Toda la serie (n=53)												
Característica radiológica	**LOH*1p***	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**	**LOH*19q***	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**	**LOH*1p19q***	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**	**Alelos intactos**	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**
Aspecto invasivo en T1												
Si	15	0.91	1.07	14	0.18	0.41	14	0.96	1.02	7	0.18	2.68
No	18		[0.32-3.56]	21		[0.11-1.53]	17		[0.32-3.31]	4		[0.66-10.77]
Señal homogénea en T2												
Si	10	0.50	1.88	10	1.00	0.90	10	0.45	1.66	3	1.00	0.92
No	23		[0.43-8.10]	25		[0.22-3.60]	21		[0.43-6.38]	8		[0.20-4.12]
Captación de contraste												
Si	20	0.32	0.13	21	0.33	0.45	18	0.16	0.39	8	0.721	1.55
No	13		[0.13-1.93]	14		[0.10-1.43]	13		[0.10-1.48]	3		[0.35-6.84]
Necrosis radiológica												
Si	4	0.06	0.23	4	0.09	0.21	3	0.02	0.17	4	0.20	2.95
No	28		[0.05-1.02]	30		[0.04-0.98]	27		[0.03-0.80]	7		[0.65-13.33]
Localización frontal												
Si	26	0.004	6.19	27	0.006	7.59	24	0.007	5.38	3	0.010	0.13
No	7		[1.66-22.68]	8		[1.84-31.34]	7		[1.51-19.13]	8		[0.03-0.60]
Localización temporal												
Si	6	0.16	0.37	6	0.14	0.33	6	0.31	0.48	5	0.10	3.69
No	27		[0.09-1.42]	29		[0.08-1.37]	25		[0.12-1.80]	6		[0.87-15.61]

I.C.95%: Intervalo de confianza al 95%.

Tumores mixtos oligoastrocitarios (n=26)												
Característica radiológica	**LOH*1p***	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**	**LOH*19q***	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**	**LOH*1p19q***	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**	**Alelos intactos**	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**
Aspecto invasivo en T1												
Si	7	1.00	1.00	7	0.66	0.46	7	1.00	1.00	5	0.66	2.14
No	7		[0.19-5.16]	9		[0.08-2.65]	7		[0.19-5.06]	3		[0.37-12.19]
Señal homogénea en T2												
Si	3	0.66	0.63	3	0.36	0.38	3	0.66	0.63	3	0.36	2.60
No	11		[0.09-4.08]	13		[0.05-2.58]	11		[0.09-4.08]	5		[0.38-17.45]
Captación de contraste												
Si	8	0.67	0.57	9	0.65	0.42	8	0.67	0.57	6	0.65	2.33
No	6		[0.10-3.18]	7		[0.06-2.41]	6		[0.10-3.18]	2		[0.35-15.30]
Necrosis radiológica												
Si	1	0.12	0.11	2	0.28	0.23	1	0.12	0.11	3	0.28	4.20
No	13		[0.01-1.26]	14		[0.03-1.86]	13		[0.01-1.26]	5		[0.53-32.95]
Localización frontal												
Si	14	0.006	0.50	16	0.001	0.37	14	0.006	0.50	3	0.001	2.66
No	0		[0.26-0.92]	0		[0.15-0.91]	0		[0.26-0.92]	5		[1.09-6.52]
Localización temporal												
Si	0	0.02	0.60	0	0.007	0.50	0	0.02	0.60	4	0.007	2.00
No	14		[0.36-0.99]	16		[0.25-1.00]	14		[0.36-0.99]	4		[1.00-3.99]

I.C.95%: Intervalo de confianza al 95%

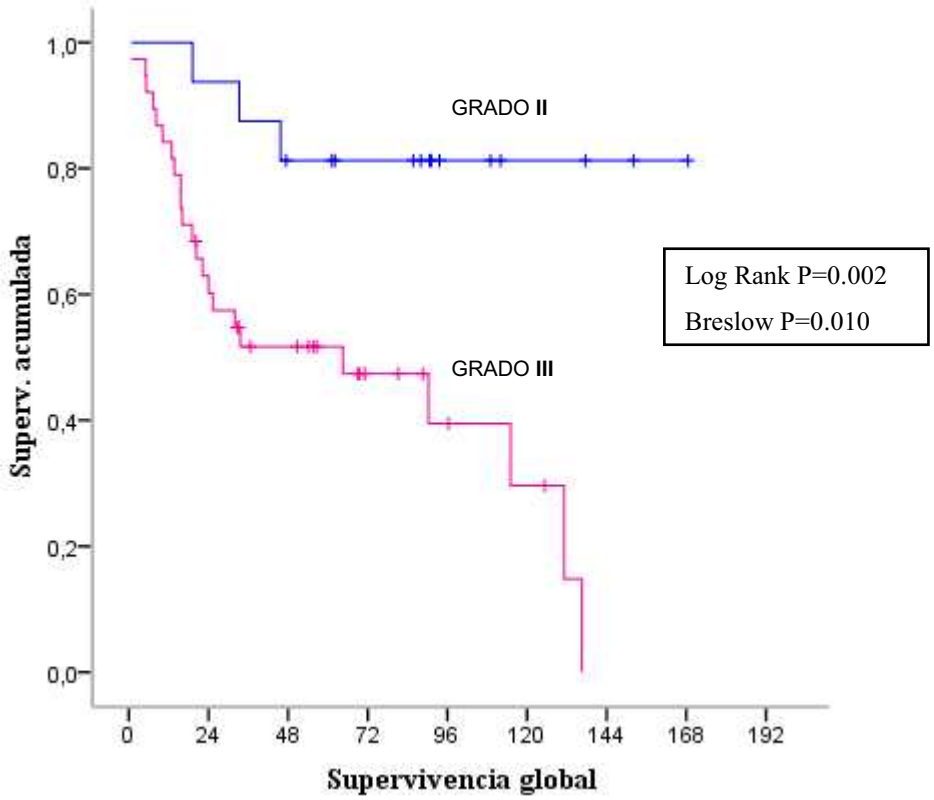
Tumores anaplásicos, grado III de la OMS (n=38)												
Característica radiológica	**LOH*1p***	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**	**LOH*19q***	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**	**LOH*1p19q***	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**	**Alelos intactos**	**P**	**Odds ratio [I.C. 95%]**
Aspecto invasivo en T1												
Si	12	0.80	1.20	11	0.22	1.28	11	0.89	1.10	6	0.22	3.81
No	10		[0.29-4.90]	13		[0.04-1.69]	10		[0.26-4.54]	2		[0.64-22.74]
Señal homogénea en T2												
Si	7	0.43	2.33	7	1.00	1.23	7	0.42	2.55	2	1.00	0.85
No	15		[0.40-13.60]	17		[0.19-7.67]	14		[0.42-14.65]	6		[0.13-5.30]
Captación de contraste												
Si	16	0.37	0.24	17	0.15	1.41	15	0.22	0.22	8	0.15	0.72
No	6		[0.02-2.30]	7		[1.09-1.82]	6		[0.02-2.16]	0		[0.56-0.91]
Necrosis radiológica												
Si	4	0.11	0.23	4	0.15	0.21	3	0.04	0.26	4	0.17	3.80
No	17		[0.04-1.13]	19		[0.03-1.21]	17		[0.05-1.39]	4		[0.69-20.80]
Localización frontal												
Si	17	0.02	6.80	19	0.002	26.6	16	0.02	6.40	1	0.003	0.045
No	5		[1.42-32.37]	5		[2.62-269.40]	5		[1.33-30.60]	7		[0.005-0.44]
Localización temporal												
Si	5	0.27	0.41	5	0.17	0.26	5	0.43	0.43	4	0.20	3.16
No	17		[0.09-1.88]	19		[0.04-1.44]	16		[0.09-2.01]	4		[0.60-16.69]

I.C.95%: Intervalo de confianza al 95%

En lo que se refiere a las variables clínicas analizadas (epilepsia, focalidad, deterioro cognitivo o hipertensión intracraneal), sólo la focalidad neurológica resultó significativamente menor en aquellos pacientes cuyos tumores mostraron LOH*1p* (P=0.048), siendo la frecuencia de aparición del resto de los signos y síntomas estudiados independiente del genotipo en nuestra serie.

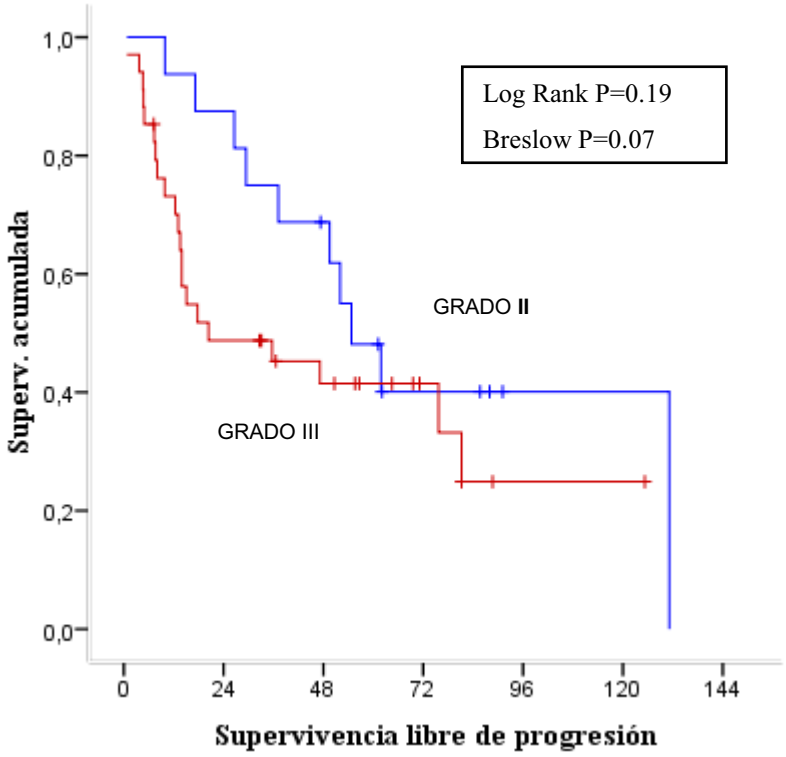
En lo que respecta al estudio de supervivencia, la mediana de supervivencia global resultó ser significativamente menor en el subgrupo de pacientes con gliomas anaplásicos, 64.5m (rango, 3.47-125.5), no habiéndose alcanzado ésta en el subgrupo de pacientes con gliomas de bajo grado (Figura III.2.).

Figura III.2. Supervivencia global en función del grado histológico



La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 20.3m (rango, 0-54.9) para los tumores anaplásicos y de 54.7m (rango, 38.2-71.3) para los tumores de bajo grado, siendo estas diferencias también estadísticamente significativas (Figura III.3.).

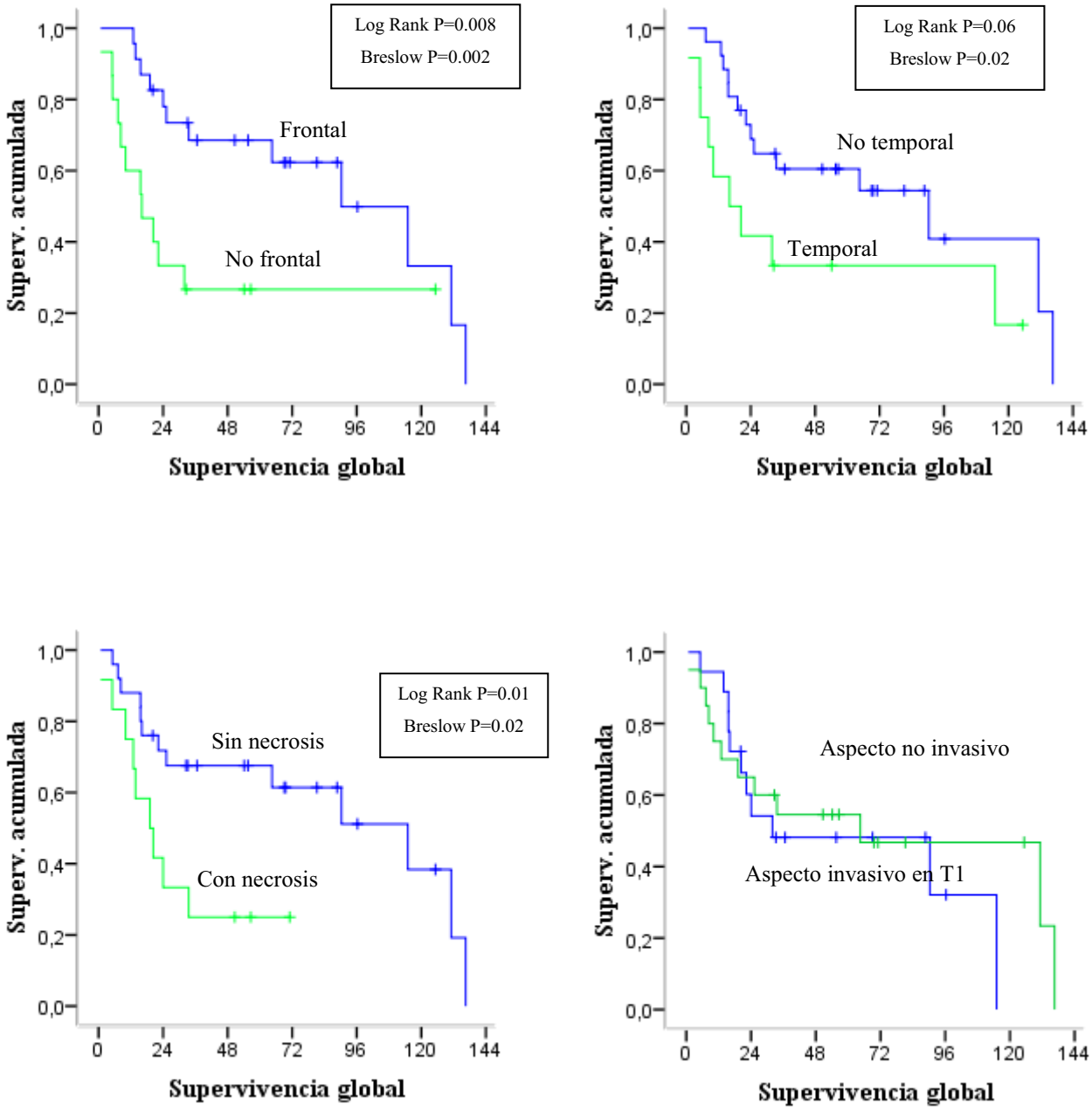
Figura III.3.: Supervivencia libre de progresión en función del grado histológico

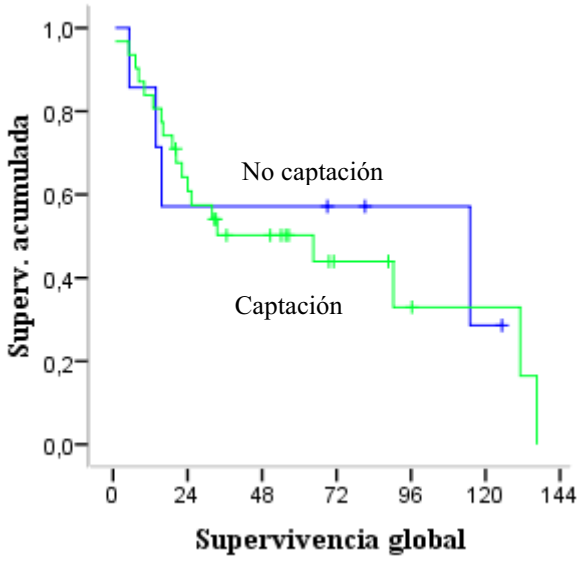


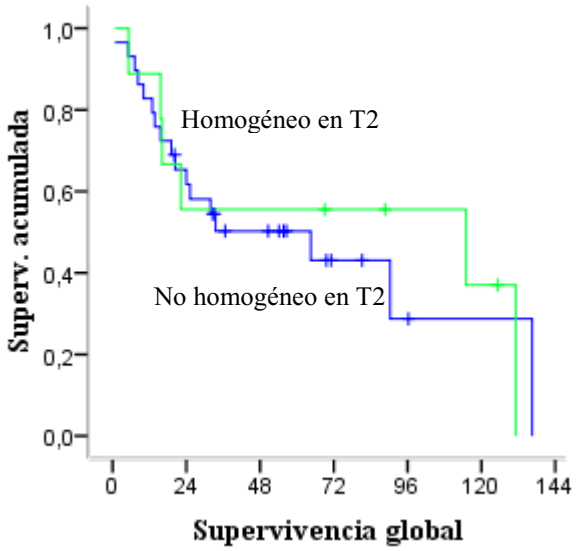
A partir de este momento del estudio, debido al número reducido de pacientes en el grupo de gliomas de bajo grado y a las diferencias observadas en términos de supervivencia entre los tumores de bajo grado y los gliomas anaplásicos, el análisis de factores pronósticos se realizó sólo en el subgrupo de pacientes con gliomas anaplásicos, tanto oligodendrogliales puros como mixtos oligoastrocitarios.

Así, en lo referente a las características radiológicas analizadas, solo la presencia de necrosis y la localización mostraron impacto pronóstico con significación estadística en el análisis univariante (Figura III.4.):

Figura III.4. Supervivencia global en función de las características radiológicas analizadas

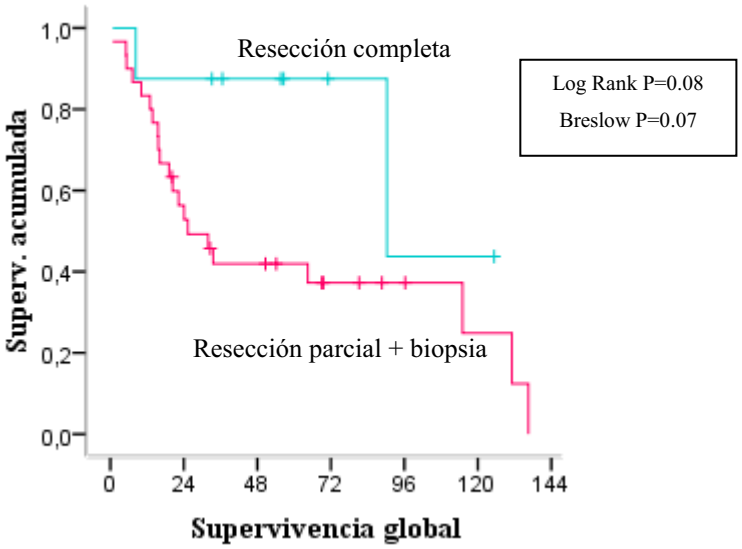






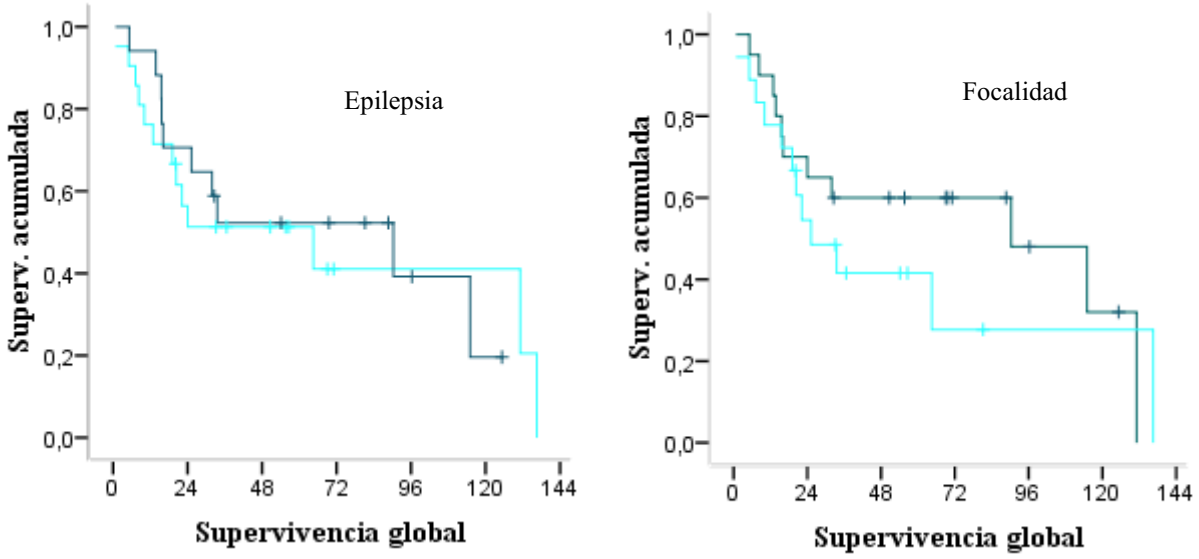
El tipo de tratamiento quirúrgico demostró una tendencia hacia una mejor supervivencia en aquellos pacientes con resección completa sin llegar a la significación estadística (Figura III.5.):

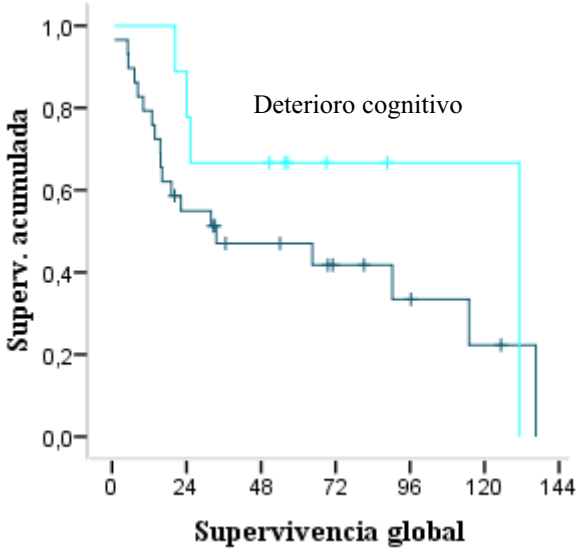
Figura III.5.: Supervivencia global según el grado de resección

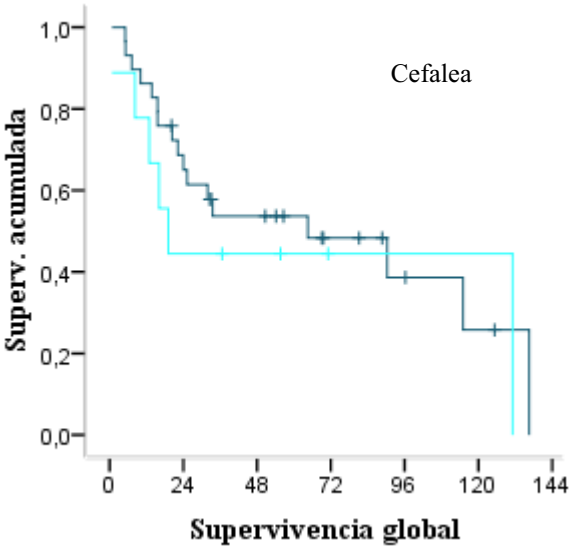


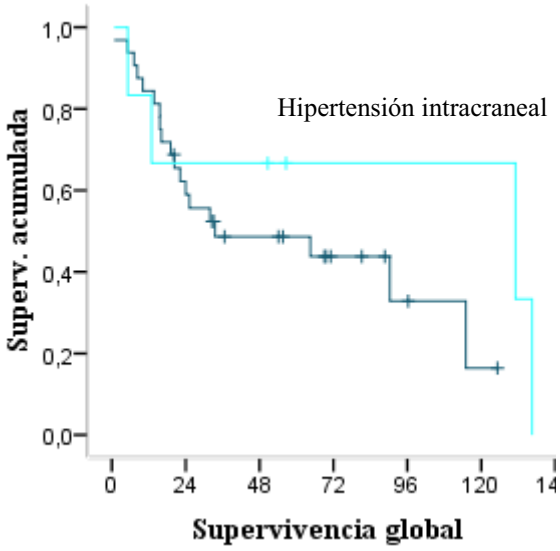
En cuanto a las variables clínicas estudiadas, ninguna de ellas demostró influencia pronóstica en nuestra serie. La edad y el estado funcional valorado mediante la escala de Karnofsky no resultaron tampoco determinantes de la supervivencia global ni libre de progresión en este subgrupo de pacientes. Del mismo modo, no se halló una diferencia significativa en la supervivencia al comparar los pacientes con tumores oligodendrogliales puros *vs* oligoastrocitarios (Figura III.6.):

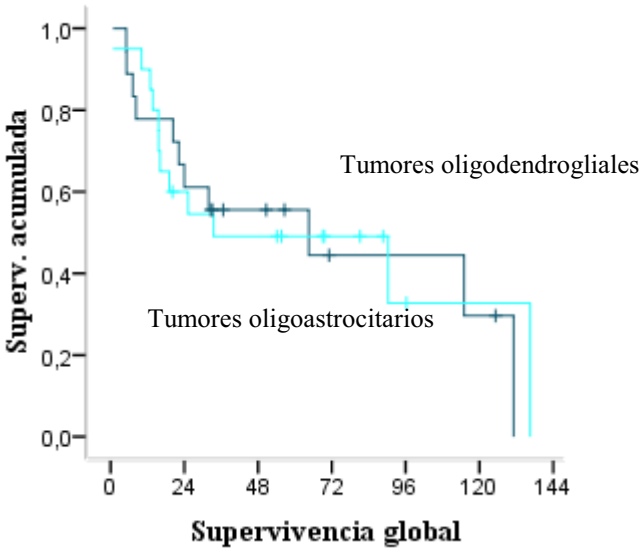
Figura III.6.: Supervivencia global en función de la clínica y el subtipo histológico











Finalmente, se analizó el valor pronóstico de las alteraciones genéticas. Tanto la presencia de LOH*1p*, como de LOH*19q* y de co-delección *1p19q* resultaron factores pronósticos con significación estadística en el análisis univariante de supervivencia global (Figura III.7.), y de supervivencia libre de progresión (Figura III.8.):

Figura III.7.: Supervivencia global en función de las alteraciones cromosómicas

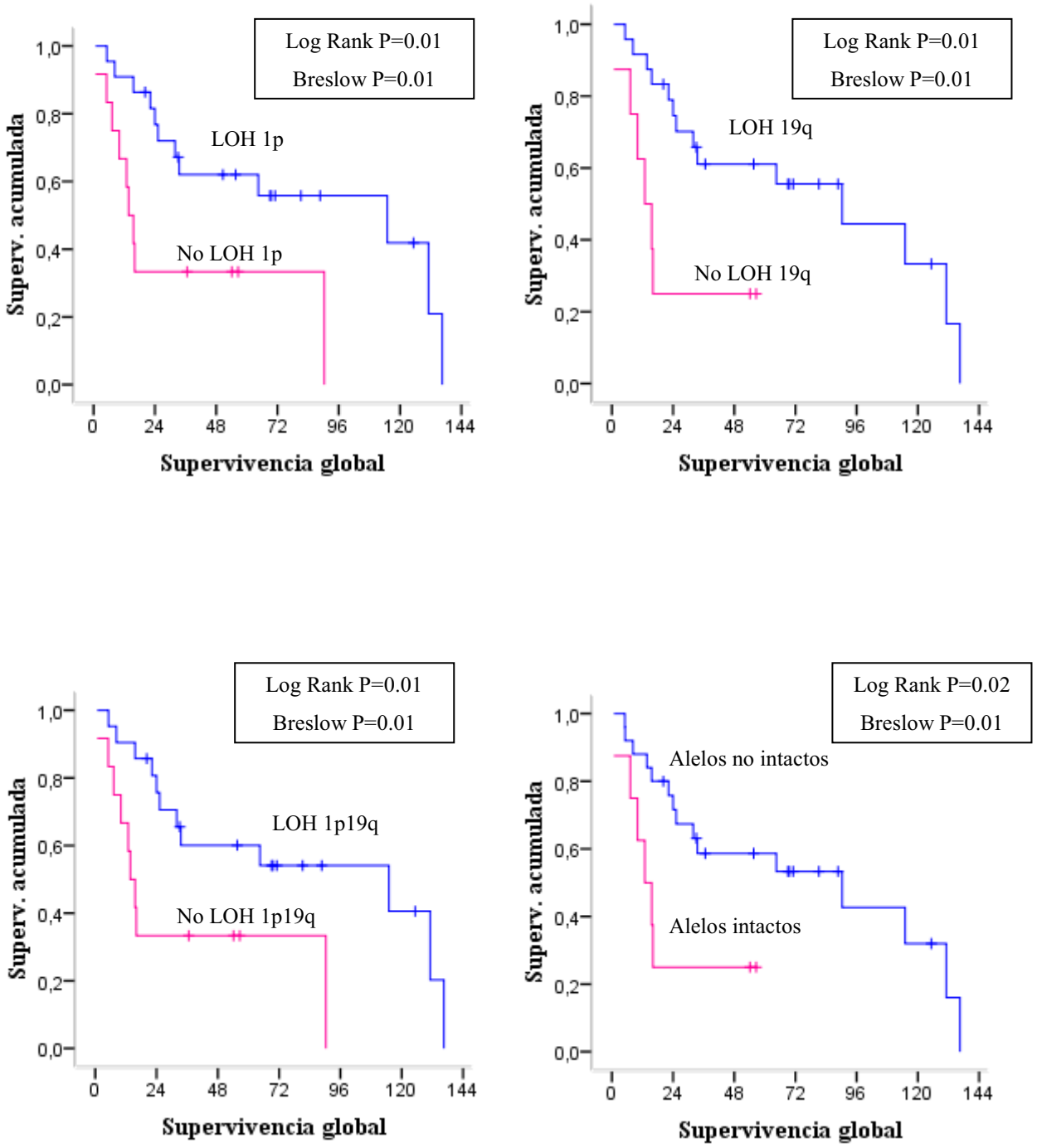
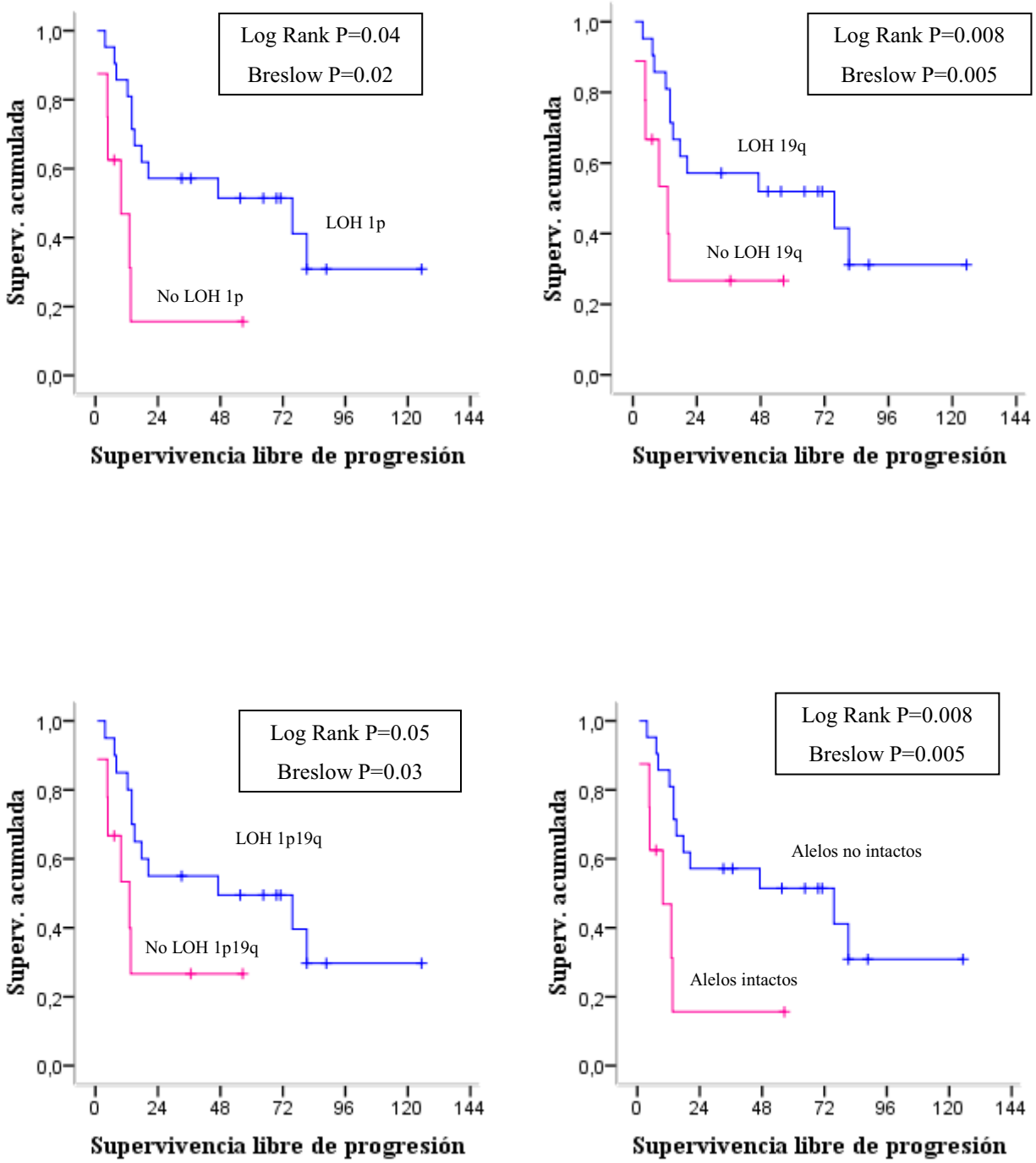


Figura III.8. Supervivencia libre de progresión en función de las alteraciones moleculares



En las Tabla III.3. y III.4. se exponen de manera resumida los resultados del análisis univariante (Tabla III.3. para supervivencia global y Tabla III.4. para supervivencia libre de progresión):

Tabla III.3.: Análisis univariante para supervivencia global (gliomas anaplásicos)

		HR	IC95%	*P*
Variables clínicas	Epilepsia	1.105	0.467-2.614	0.820
	Focalidad	0.694	0.296-1.623	0.400
	Deterioro cognitivo	0.853	0.530-1.372	0.512
	HTIC	1.488	0.709-3.124	0.292
	Cefalea	1.382	0.800-2.385	0.245
	Tipo de cirugía	1.831	1.831-3.800	0.104
Variables histológicas	Histología pura *vs* mixta	1.012	0.663-1.542	0.955
Variables radiológicas	Necrosis radiológica	0.578	0.361-0.923	0.021
	Localización frontal	1.756	1.134-2.720	0.011
	Localización temporal	0.667	0.431-1.034	0.070
	Aspecto invasvo	1.122	0.728-1.728	0.600
	Homogéneo	1.067	0.654-1.741	0.792
	Captación	0.944	0.541-1.645	0.839
Variables moleculares	LOH*1p*	1.782	1.113-2.853	0.016
	LOH*19q*	1.894	1.119-3.204	0.017
	LOH*1p19q*	1.738	1.086-2.784	0.021
	Alelos intactos	0.564	0.337-0.944	0.029

HTIC: Hipertensión intracraneal

Tabla III.4.: Análisis univariante para supervivencia libre de progresión (gliomas anaplásicos)

		HR	IC95%	*P*
Variables clínicas	Epilepsia	1.129	0.723- 1.764	0.592
	Focalidad	0.851	0.552- 1.312	0.465
	Deterioro cognitivo	0.808	0.500- 1.306	0.385
	HTIC	0.618	0.501- 1.507	0.618
	Cefalea	1.292	0.779- 2.144	0.319
	Tipo de cirugía	7.259	0.971- 54.253	0.053
Variables histológicas	Histología pura *vs* mixta	0.675	0.428- 1.064	0.091
Variables radiológicas	Necrosis radiológica	0.707	0.440- 1.138	0.153
	Localización frontal	1.520	0.978- 2.360	0.062
	Localización temporal	0.646	0.415- 1.005	0.053
	Aspecto invasvo	1.079	0.701- 1.662	0.727
	Homogéneo	1.049	0.634- 1.737	0.850
	Captación	0.855	0.478- 1.529	0.598
Variables moleculares	LOH*1p*	1.667	0.992- 2.800	0.053
	LOH*19q*	1.958	1.153-3.326	0.012
	LOH*1p19q*	1.617	0.963-2.716	0.068
	Alelos intactos	0.510	0.300-0.867	0.012

HTIC: Hipertensión intracraneal

Finalmente, se efectuó un análisis multivariante mediante regresión de Cox incluyendo en el mismo aquellos factores que mostraron un nivel de significación P≤0.1 en el análisis multivariante. A pesar de la fuerte asociación hallada entre las delecciones cromosómicas y la localización tumoral, el cálculo del coeficiente de kappa mostró un nivel bajo de concordancia entre ambas (κ=0.38;P=0.007), por lo que las dos fueron incluidas en el análisis multivariante (Tabla III.5. para supervivencia global y Tabla III.6. para supervivencia libre de progresión).

La localización frontal y la presencia de necrosis radiológica fueron las variables que demostraron ser factores pronósticos independientes de supervivencia global junto con el grado

de resección que se mostró como factor pronóstico independiente tanto de supervivencia global como de supervivencia libre de progresión.

Tabla III.5.: Análisis multivariante para supervivencia global (gliomas anaplásicos)

Variables en la ecuación								
							IC 95,0%	
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Inferior	Superior
Localización frontal	1.504	.754	3.980	1	.046	4.499	1.027	19.708
Presencia de necrosis	-1.548	.608	6.484	1	.011	.213	.065	.700
Tipo de cirugía	2.223	0.852	6.802	1	.009	9.231	1.737	49.050
Presencia de LOH1p19q	.563	.748	.566	1	.452	1.755	.405	7.605

Tabla III.6.: Análisis multivariante para supervivencia libre de progresión (gliomas anaplásicos)

Variables en la ecuación								
							IC 95%	
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Inferior	Superior
Localización frontal	.819	.468	.118	1	.732	1.174	.469	2.939
Histología pura *vs* mixta	-.141	.307	.212	1	.645	.868	.476	1.585
Tipo de cirugía	2.608	1.137	5.260	1	.022	13.572	1.461	126.069
Presencia de LOH1p19q	.161	.468	.118	1	.732	1.174	.469	2.939

Al analizar el subgrupo de pacientes con oligoastrocitomas anaplásicos, la localización, y la necrosis radiológica fueron las variables con influencia pronóstica sobre la supervivencia global y estas mismas junto con la HTIC sobre la supervivencia libre de progresión en el análisis univariante, además de las características moleculares. (Tabla III.7. para supervivencia global y Tabla III.8. para supervivencia libre de progresión):

Tabla III.7.: Análisis univariante para supervivencia global (oligoastrocitomas anaplásicos)

		HR	IC95%	*P*
Variables clínicas	Epilepsia	1.133	0.330-3.886	0.842
	Focalidad	0.712	0.215-2.351	0.578
	Deterioro cognitivo	0.321	0.089-1.163	0.083
	HTIC	1.210	0.146-9.995	0.859
	Cefalea	3.265	0.411-25.925	0.263
	Tipo de cirugía	1.863	0.233-14.894	0.557
Variables radiológicas	Necrosis radiológica	0.125	0.034-0.457	0.001
	Localización frontal	3.834	1.053-13.949	0.041
	Localización temporal	0.329	0.084-1.291	0.111
	Aspecto invasvo	0.730	0.221-2.414	0.607
	Homogéneo	1.043	0.220-4.926	0.957
	Captación	1.042	0.220-4.929	0.957
Variables moleculares	LOH*1p*	5.224	1.314-20.765	0.018
	LOH*19q*	5.329	1.379-20.592	0.015
	LOH*1p19q*	5.224	1.314-20.765	0.018
	Alelos intactos	0.187	0.048-0.724	0.015

HTIC: Hipertensión intracraneal

Tabla III.8.: Análisis univariante para supervivencia libre de progresión (oligoastrocitomas anaplásicos)

		HR	IC95%	*P*
Variables clínicas	Epilepsia	2.602	0.891- 7.600	0.080
	Focalidad	0.498	0.165- 1.503	0.216
	Deterioro cognitivo	0.460	0.141- 1.497	0.197
	HTIC	0.136	0.022- 0.835	0.031
	Cefalea	3.680	0.804- 16.839	0.093
	Tipo de cirugía	24.407	0.011- 53066.0	0.415
Variables radiológicas	Necrosis radiológica	0.204	0.062- 0.667	0.008
	Localización frontal	4.988	1.314- 18.938	0.018
	Localización temporal	0.200	0.052- 0.764	0.018
	Aspecto invasvo	0.715	0.2464- 2.077	0.538
	Homogéneo	1.119	0.310- 4.039	0.862
	Captación	0.668	0.149- 2.996	0.598
Variables moleculares	LOH*1p*	10.215	1.992- 52.393	0.005
	LOH*19q*	10.215	1.992- 52.393	0.005
	LOH*1p19q*	10.215	1.992- 52.393	0.005
	Alelos intactos	0.097	0.019-0.502	0.005

HTIC: Hipertensión intracraneal

En el análisis multivariante, la necrosis radiológica resultó ser factor pronóstico independiente de supervivencia global y libre de progresión en este subgrupo de tumores (Tabla III.9.).

Tabla III.9.: Análisis multivariante para supervivencia global (oligoastrocitomas anaplásicos)

Variables en la ecuación								
							IC 95%	
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Inferior	Superior
Presencia de LOH1p19q	1.346	1.041	1.671	1	.196	3.844	.499	29.594
Presencia de necrosis	-3.079	1.009	9.310	1	.002	.046	.006	.332
Localización frontal	1.220	1.034	1.392	1	.238	3.386	.447	25.669
Deterioro cognitivo	-.781	.823	.900	1	.343	.458	.091	2.299

Tabla III.10.: Análisis multivariante para supervivencia libre de progresión (oligoastrocitomas anaplásicos)

Variables en la ecuación								
							IC 95%	
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Inferior	Superior
Presencia de LOH1p19q	-.320	1.844	.030	1	.862	.726	.020	26.970
Presencia de necrosis	-1.817	.850	4.570	1	.033	.162	.031	.860
Localización frontal	3.648	2.259	2.607	1	.106	38.402	.458	3217.133
Hipertensión intracraneal	-4.606	1.766	6.804	1	.009	.010	.000	.318

6. DISCUSIÓN

El análisis histológico continúa siendo en la actualidad el estándar de oro para el diagnóstico de los gliomas, su tipificación y la toma de decisiones terapéuticas en la práctica clínica diaria (Kim et al., 2005). Es además en base a los aspectos morfológicos, sobre los que se infiere el pronóstico de los pacientes (Engelhard et al., 2002; Gadji et al., 2009; Louis et al., 2007).

Sin embargo, la clasificación histológica de los tumores oligodendrogliales puede resultar compleja especialmente en el caso de los oligoastrocitomas (Blesa et al., 2009; Jeuken et al., 2001) y es, en cualquier caso, claramente insuficiente para deducir a partir de ella la quimiosensibilidad tumoral o el pronóstico de los pacientes (Nutt, 2005).

Debido a la subjetividad de ciertos criterios diagnósticos, al hecho de no disponer hasta el momento de un marcador inmunohistoquímico específico de oligodendroglioma (Smith et al., 2000) y a las importantes variaciones en las características fenotípicas que muestran estos tumores (Reifenberger y Louis, 2003), existe una significativa variabilidad diagnóstica interobservador, incluso entre neuropatólogos expertos (Coons et al., 1997; Dong et al., 2002; Qu et al., 2007; Smith et al., 2000; Stupp et al., 2006; Ueki et al., 2002; van den Bent y Kros, 2007).

Así, algunos estudios han demostrado que el consenso en el diagnóstico entre neuropatólogos es de alrededor del 86% en el mejor de los casos (Kros et al., 2007), siendo incluso menor al 50% entre patólogos no especializados en la mayoría de las series publicadas (Kouwenhoven et al., 2009; Popko et al., 2002; Smith et al., 2000; Stupp et al., 2006; Ueki et al., 2002).

Probablemente, debido a los motivos anteriormente expuestos, la incidencia relativa de oligodendrogliomas y oligoastrocitomas respecto al resto de los gliomas ha variado clásicamente de institución a institución (Burger et al., 2001; Fortin et al., 1999). Por ello existe un gran interés en identificar marcadores moleculares que de manera objetiva permitan hacer el diagnostico de tumor oligodendroglial, y ayuden a definir el pronóstico de los pacientes de manera más precisa (Smith et al., 2000).

En el pasado, esta variabilidad diagnóstica entre centros y la falta de consenso entre patólogos adolecía de implicaciones mínimas debido a que las posibilidades terapéuticas eran

menores que en la actualidad (Reifenberger y Louis, 2003). Sin embargo, esta situación cambió drásticamente en el momento en que se demostró la mayor quimiosensibilidad de los oligodendrogliomas anaplásicos respecto a otros gliomas (Cairncross et al., 1998; van den Bent y Kros, 2007). A partir de entonces, en todos los centros se produjo un claro incremento en la proporción de gliomas clasificados como oligodrendrogliales. Lógicamente esto no traducía un incremento real de la incidencia de estos tumores, sino un cambio en la valoración diagnóstica con una mayor laxitud de los criterios histológicos para definición de los mismos, obedeciendo probablemente al deseo de no excluir a ningún paciente del eventual beneficio del tratamiento quimioterápico (Reifenberger y Louis, 2003; Walker et al., 2004).

De este modo, la proporción reportada de tumores oligodendrogliales se ha visto incrementada de manera progresiva en la última década desde aproximadamente un 5% del total de los gliomas, hasta el 33% en algunas series recientes (Cairncross, 2004; Ferrer-Luna et al., 2009; Kapoor et al., 2009; Reifenberger y Louis, 2003; van den Bent et al., 2003; Walker et al., 2005).

Sin embargo, una clasificación de acuerdo a criterios menos exigentes conlleva el peligro de considerar erróneamente algunos tumores astrocitarios como oligodendrogliales y *por ende* de sobre-indicar tratamientos no exentos de toxicidad o efectos adversos a pacientes que no se beneficiarán de ello (Popko et al., 2002).

En los últimos años, todos estos aspectos junto con la demostración de una clara asociación entre histología oligodendroglial clásica y presencia de la co-delección *1p19q* (McDonald et al., 2005), han iniciado una tendencia, apoyada cada vez por más neuropatólogos, hacia la consideración de LOH*1p19q* como distintivo diagnóstico de tumor oligodendroglial y no sólo como factor predictivo de respuesta al tratamiento o pronóstico de supervivencia (Aldape et al., 2007; Bigner et al., 1999; Burger et al., 2001; Jeuken et al., 2001; McLendon et al., 2005; van den Bent and Kros, 2007; Vogelbaum et al., 2009).

Debido a la complejidad de las técnicas de laboratorio y a la falta de disponibilidad para realizar los test moleculares todavía en muchos centros, diversos grupos han desarrollado líneas de investigación en busca de factores clínicos del tumor o del paciente que se relacionen con el perfil molecular. El objetivo perseguido es, obviamente, la identificación de características propias del tumor o del paciente a partir de las que inferir el estado de *1p19q* sin necesidad de realizar el test genético (Kim et al., 2005) para de este modo, subclasificar de manera más concreta y específica estos tumores (Kapoor et al., 2009). De alcanzarse este objetivo, la utilidad práctica resultaría obvia, y la aplicabilidad evidente.

Hoy en día la RM cerebral forma parte del estudio preoperatorio rutinario de todos los pacientes con diagnóstico de tumor cerebral y además, por tratarse de una prueba no invasiva puede repetirse cuantas veces resulte necesario a lo largo de su evolución (Huang et al., 2008; Megyesi et al., 2004; Whitmore et al., 2007; Zlatescu et al., 2001). Por ello, algunos de los factores relacionados con el tumor sobre los que se han centrado estos estudios han sido precisamente características radiológicas entre las que se incluyen la captación de contraste (Walker et al., 2005), el patrón espectroscópico (Jenkinson et al., 2005), la localización (Mueller et al., 2002; Zlatescu et al., 2001) o el perfil metabólico en el PET (Walker et al., 2004).

Otros aspectos relacionados con el tumor han sido algunos detalles anatomopatológicos como, por ejemplo, el patrón histológico o la celularidad (Burger et al., 2001; Kim et al., 2005; Ueki et al., 2002; van den Bent et al., 2003; Watanabe et al., 2002). Finalmente, de entre los factores clínicos analizados en relación con el paciente cabe señalar la edad (Kim et al., 2005; van den Bent et al., 2003; Walker et al., 2005), el tipo de sintomatología, y la duración de la misma desde el debut clínico hasta el diagnóstico (van den Bent et al., 2003).

Lógicamente el interés por identificar la presencia de LOH*1p*, LOH*19q* o LOH*1p19q* en los tumores oligodendrogliales obedece, tal como se ha expuesto en el apartado Introducción, al hecho de que esta pérdida de heterocigosidad define subgrupos de pacientes con diferencias en cuanto al pronóstico y a la respuesta al tratamiento. En concreto la delección de *1p* divide a los pacientes en dos grupos con una clara diferencia pronóstica (Ueki et al., 2002; van den Bent et al., 2003), habiéndose demostrado una supervivencia libre de progresión hasta cuatro veces superior en el subgrupo de pacientes cuyos tumores la presentan (Eoli et al., 2006).

La proporción de tumores que en nuestra serie mostraron delección de *1p*, *19q* o co-delección de *1p19q* fue similar a la de otras series de la literatura, al igual que la proporción de tumores localizados en el lóbulo frontal, temporal o en otras partes del encéfalo (Bigner et al., 1999; Kouwenhoven et al., 2009; Kros et al., 2007; McDonald et al., 2005; Smith et al., 2000; van den Bent et al., 2008).

Del mismo modo que Chahlavi et al.(Chahlavi et al., 2003), Hoang-Xuan et al.(Hoang-Xuan et al., 2001) y otros autores, no hallamos diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de las delecciones en relación al grado histológico, siendo la proporción de delecciones cromosómicas similar en los gliomas de bajo grado frente a los anaplásicos.

Así mismo, y aunque desde un punto de vista lógico en los tumores mixtos cabría esperar una frecuencia intermedia entre la propia de los tumores oligodendrogliales puros y la de los astrocitarios (Brandes et al., 2006; Smith et al., 2000; Walker et al., 2006), no hallamos

en nuestra serie diferencias estadísticamente significativas en la proporción de tumores con co-delección *1p19q* en función de la histología oligodendroglial pura u oligoastrocitaria mixta.

Respecto a la asociación entre las características radiológicas y moleculares, nuestros resultados se muestran acordes con los de otras series de la literatura (Laigle-Donadey et al., 2004; McDonald et al., 2005; Mueller et al., 2002; Zlatescu et al., 2001). En primer lugar, se confirma la existencia de la heterogeneidad molecular región-dependiente en los tumores oligodendrogliales apuntada previamente por diversos autores (Eoli et al., 2006; Huang et al., 2008; Kouwenhoven et al., 2009). Así, los tumores localizados en el lóbulo frontal mostraron con mayor frecuencia LOH*1p,* LOH*19q* y LOH*1p19q,* mientras que aquellos con alelos intactos se situaron fundamentalmente en el lóbulo temporal. Esta asociación mantuvo la significación estadística en el subanálisis realizado sobre los tumores oligoastrocitarios confirmando los resultados de Qu et al. (Qu et al., 2007). Así mismo, se halló una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de LOH*1p19q* y la ausencia de necrosis radiológica tanto en la serie global como en el subgrupo de gliomas anaplásicos (Kim et al., 2010).

A diferencia de otros estudios (Jenkinson et al., 2006; Kim et al., 2010; Megyesi et al., 2004), no hallamos en nuestra serie asociación significativa entre LOH*1p19q* y el resto de las variables radiológicas analizadas: la presencia de límites mal definidos, el aspecto invasivo en las secuencias potenciadas en T1, la homogeneidad tumoral valorada en las secuencias potenciadas en T2 o la captación de contraste paramagnético. El hecho de que nuestra serie incluya tanto tumores oligodendrogliales como oligoastrocitarios puede haber influido en este aspecto.

A pesar de que existen algunas excepciones (van den Bent et al., 2003; Walker et al., 2005), la localización es de todas las características radiológicas, la que parece haber demostrado una asociación más sólida con el perfil molecular en los oligodendrogliomas (Brandes et al., 2006; Koeller et al., 2000; Laigle-Donadey et al., 2004; McDonald et al., 2005; Mueller et al., 2002; Qu et al., 2007; van den Bent et al., 2008; Zlatescu et al., 2001), y así lo corroboramos en nuestra serie.

Del mismo modo, los oligoastrocitomas que se originan en el lóbulo temporal parecen aproximarse más genéticamente a los astrocitomas, muestran con mayor frecuencia mutación de *TP53* y con menor frecuencia LOH*1p19q*, mientras que aquellos localizados en el lóbulo frontal parecen tener un comportamiento biológico y una identidad genética más similar a la de los oligodendrogliomas, y consiguientemente presentan con mayor frecuencia LOH*1p19q* (Louis et al., 2007).

A pesar de ser el lóbulo frontal el más voluminoso en proporción al resto de los que componen la anatomía encefálica, es un hecho bien conocido que la distribución anatómica de los gliomas no depende exclusivamente del volumen relativo de unos lóbulos cerebrales respecto de otros, sino que probablemente tenga relación con factores químicos, estructurales o genéticos que condicionan la patogénesis de los mismos (Larjavaara et al., 2007).

Ya estudios clínico-patológicos clásicos sobre oligodendrogliomas apuntaban al lóbulo frontal como el lugar de asentamiento más frecuente de este tipo de neoplasias y, aunque se desconocían las razones de ello, concluían que la localización del tumor podía tener influencia en el pronóstico de los pacientes (Kros et al., 1994; Shaw et al., 1992).

Aunque el fundamento biológico de la asociación genético-radiológica continua siendo desconocido en la actualidad, se especula con dos posibles hipótesis. En primer lugar podría deberse o al menos relacionarse con las características del medio extracelular (Mukasa et al., 2002). En este sentido, factores de crecimiento celular o determinadas moléculas secretadas característicamente por áreas concretas del cerebro, podrían facilitar el crecimiento de manera específica de determinadas células precursoras/neoplásicas y no de otras, por ejemplo, de aquellas con LOH*1p19q* (Huang et al., 2009; Zlatescu et al., 2001).

La segunda posibilidad apuntada por Cairncross et al. (Cairncross et al., 1998) es que la diferenciación de la extirpe oligodendroglial se produzca de manera muy precoz durante el desarrollo embrionario, originándose a partir de la misma la segregación de distintas subpoblaciones de oligodendrocitos que adoptarán a su vez diferentes vías de migración para colonizar de manera dirigida áreas cerebrales específicas (Cairncross, 2004; Thomas et al., 2000). Así, diferentes poblaciones celulares progenitoras podrían dar lugar a distintos tipos de tumores oligodendrogliales en función de la localización, y ello determinaría el eventual comportamiento biológico de los mismos y finalmente el pronóstico del paciente (Mueller et al., 2002).

Cualquiera que sea la verdadera razón, lo cierto es que todos estos datos refuerzan la idea de que los tumores oligodendrogliales de localización frontal constituyen un grupo de neoplasias biológicamente distinto al grupo de tumores que aun siendo morfológicamente idénticos asientan fuera del lóbulo frontal. Del mismo modo, todas estas reflexiones sobre los oligodendrogliomas, son igualmente aplicables a los tumores mixtos oligoastrocitarios ya que se acepta en la actualidad, que los oligoastrocitomas son neoplasias clonales que se originan de una sola célula precursora y no la concurrencia de dos tumores (oligodendroglioma y astrocitoma) desarrollándose en colisión. Mediante microdisección del componente astrocitario y oligodendroglial, ha podido demostrarse que, aunque con algunas excepciones, las alteraciones

moleculares de ambos componentes de un mismo tumor son idénticas (Dong et al., 2002; Kraus et al., 1995; Qu et al., 2007). Por el contrario, la asociación entre localización tumoral y presencia de LOH*1p19q* parece no existir en los tumores de estirpe astrocitaria pura (Huang et al., 2009).

Finalmente, la existencia de una relación no casual entre el genotipo de un tumor y su localización anatómica no es exclusiva de los gliomas, habiéndose también descrito en otros tumores de la economía sistémica. Así, las neoplasias de colon que presentan mutación de *TP*53 se localizan fundamentalmente en el hemicolon izquierdo y parecen tener peor pronóstico que aquellas ubicadas en el hemicolon derecho y con *TP*53 intacto (Lleonart et al., 1998).

En lo que se refiere a las variables clínicas analizadas no hallamos en nuestra serie, a diferencia de otros autores (Walker et al., 2005; Wu et al., 2010), una asociación estadísticamente significativa entre el perfil genético del tumor y las variables analizadas a excepción de la focalidad neurológica, siendo este resultado de significado incierto. Por lo tanto, en nuestra serie, el perfil genético no parece influir en la expresión clínica de los tumores oligodendrogliales, ni en el grado de resección quirúrgica alcanzado.

A pesar de que la asociación entre determinadas características radiológicas y la presencia de LOH*1p19q* ha sido corroborada por varios grupos (Brandes et al., 2006; Laigle-Donadey et al., 2004; Zlatescu et al., 2001) y de la influencia pronóstica de la co-delección *1p19q*, se desconoce hasta la fecha si las características radiológicas asociadas a LOH*1p19q* tienen *per se* impacto pronóstico (Goze et al., 2009; Kuo et al., 2009). En este sentido, Zlatescu et al. (Zlatescu et al., 2001) observan una menor tasa de respuestas al tratamiento quimioterápico de los oligodendrogliomas anaplásicos localizados en el lóbulo temporal, en la ínsula o en el diencéfalo en relación a otras localizaciones. Sin embargo, ello no se traduce posteriormente en diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes.

Por ello, en la segunda parte de nuestro estudio se realizó un análisis de supervivencia para evaluar por una parte el impacto pronóstico de las variables radiológicas, clínicas y moleculares analizadas, tanto en la serie global como en el subgrupo de pacientes con oligoastrocitomas, y por otra parte en un intento de clarificar si los factores clínicos y radiológicos clásicamente considerados y aceptados como pronósticos, son en realidad expresión subrogada de las alteraciones moleculares y, por ello, influyentes en la evolución de los pacientes.

Los factores clínicos que clásicamente han sido aceptados como pronósticos en los tumores oligodendrogliales son la edad, el estado funcional, la localización frontal, la presencia de calcificaciones en la TC craneal preoperatoria, la ausencia de captación de contraste en las

pruebas de neurimagen preoperatorios, el debut de la enfermedad con crisis comiciales y el grado de resección (Choi et al., 2010; Daumas-Duport et al., 1997; Fortin et al., 2001; Koeller et al., 2000; Kros et al., 1994; Kuo et al., 2009; Park et al., 2009; Shaw et al., 1992; van den Bent et al., 2003). Las verdaderas razones por las cuales estas variables se comportan como factores de pronóstico favorable son hasta la fecha desconocidas, de modo que una eventual asociación de éstas con la presencia de LOH*1p19q* en el tumor podría ser, al menos parcialmente, la explicación de ello.

La presentación clínica en forma de epilepsia, no se asoció en nuestra serie a un pronóstico favorable debido probablemente a que más de la mitad de los pacientes (57%) presentaron crisis comiciales como manifestación de debut. Del mismo modo, la cefalea, la focalidad neurológica o los signos y síntomas de hipertensión intracraneal no se asociaron a supervivencias globales ni libres de enfermedad significativamente menores en el análisis de la serie completa, a diferencia de otras series de la literatura (Celli et al., 1994; Hamlat et al., 2006). Es decir, en nuestra serie, tal como se ha expuesto previamente, el perfil genético no parece influir en la forma de expresión clínica de los tumores y además, las manifestaciones clínicas no se traducen en diferencias pronósticas.

En cuanto al grado de resección, si bien existe todavía cierta controversia al respecto, en la actualidad es aceptado en términos generales que la resección completa posee un impacto pronóstico favorable en la supervivencia frente a las resecciones incompletas y, por supuesto, frente a las biopsias (Allam et al., 2000; Park et al., 2009; Ramirez et al., 2010; Sanai y Berger, 2008). Los resultados de nuestra serie así lo confirman, de modo que la resección completa resultó ser factor pronóstico independiente de supervivencia global y libre de progresión en el análisis de la serie global, aunque no fue así en el subgrupo de pacientes con tumores mixtos. La localización topográfica de los tumores puede, en este sentido, condicionar las opciones quirúrgicas y por lo tanto, de una manera indirecta podría influir sobre el pronóstico de los pacientes, sin embargo, no hallamos en nuestra serie asociación significativa entre la localización y el tipo de cirugía realizada.

En nuestra serie no hallamos tampoco diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de los pacientes con oligodendrogliomas anaplásicos respecto a aquellos con oligoastrocitomas anaplásicos, al igual que en otros estudios previamente publicados (DeAngelis, 2009; Fortin et al., 2001; Kanamori et al., 2009; Park et al., 2009). Actualmente existe una cierta controversia en cuanto al pronóstico de los oligoastrocitomas. Algunos autores sugieren que en los tumores mixtos cabria esperar un pronóstico intermedio entre el de los oligodendrogliomas puros y el de los astrocitomas (Koeller et al., 2000). Sin embargo, entre los

estudios publicados se observa una importante variabilidad en la supervivencia del subgrupo de pacientes con oligoastrocitomas (Huang et al., 2008; Mueller et al., 2002; van den Bent et al., 2008). Esta variabilidad parece estar más relacionada con el genotipo subyacente que con el subtipo histológico (Walker et al., 2006). Por ello, en la actualidad todos los estudios sobre oligodendrogliomas estratifican los pacientes en función del estado de *1p19q* y no sólo en base a la anatomía patológica (DeAngelis, 2009).

En el análisis univariante, la localización frontal y la necrosis radiológica resultaron factores pronósticos de supervivencia global tanto en el conjunto de toda la serie como en el subanálisis realizado en los oligoastrocitomas anaplásicos. Pero, tal como señalan algunos autores (Kim et al., 2005) existe la posibilidad de que el impacto pronóstico de estas variables radiológicas se deba en realidad a su correlación con las alteraciones moleculares. Así, la captación anular ha sido señalada en series previas (Cairncross et al., 1998; Choi et al., 2010; Ino et al., 2001) como factor pronóstico fuertemente asociado a la ausencia de delección cromosómica. En nuestra serie, tanto la localización frontal como la necrosis radiológica demostraron asociación estadísticamente significativa con la co-delección *1p19q,* de modo que LOH*1p19q* resultó más frecuente en los tumores de asentamiento frontal y que no mostraban necrosis radiológica.

Los factores moleculares LOH*1p*, LOH*19q* y LOH*1p19q* resultaron, del mismo modo que la localización, factores de pronóstico favorable en nuestra serie y, tal como se ha expuesto en el apartado de Resultados se halló una fuerte asociación entre la localización frontal y la presencia de los mismos. Por este motivo, en el análisis multivariante de regresión se incluyeron ambas variables, permaneciendo la localización frontal como factor pronóstico independiente de supervivencia global para toda la serie y la presencia de necrosis radiológica como factor de mal pronóstico para la supervivencia global y libre de progresión en los oligoastrocitomas anaplásicos. El número limitado de pacientes de nuestra serie obliga no obstante a considerar estos resultados con precaución, y probablemente justifica que las alteraciones cromosómicas no hayan resultado factores de pronóstico independientes en el análisis global o en el subgrupo de oligoastrocitomas, tal como sucede en otras series de la literatura (Okamoto et al., 2004; Weller et al., 2007; Wu et al., 2010).

Tal y como señalan Ramirez et al. (Ramirez et al., 2010), la presencia de LOH*1p19q* no implica *per se* un pronóstico concreto y constante en todos aquellos pacientes cuyos tumores presentan la delección, ya que, tal como se observa en la presente serie, algunos de los pacientes de este subgrupo no responderán al tratamiento complementario ni presentarán larga

supervivencia. Esta observación es crítica a la hora de intentar inferir el pronóstico individual de un paciente en la práctica clínica diaria.

En el intento de esclarecer las razones de ello, algunos grupos han demostrado que la presencia de LOH*10q* implica mal pronóstico independientemente del estado de *1p19q*, no siendo además ambas características genéticas mutuamente excluyentes como sucede en otros casos sino que pueden coexistir en el mismo tumor. En ese caso LOH*10q* parece ser un indicador pronóstico más preciso incluso que LOH*1p19q* (Ramirez et al., 2010), y por ello los autores aconsejan la valoración simultánea de 10q.

Del mismo modo, la presencia de delecciones parciales de *1p* que aunque poco frecuentes pueden pasar desapercibidas con las técnicas de laboratorio de uso más cotidiano, no se asocian a un mejor pronóstico en los pacientes con tumores oligoendrogliales. Las delecciones parciales de *1p* no son infrecuentes en los astrocitomas, pero el significado de estas es ciertamente distinto al de las delecciones completas, de manera que algunos autores las consideran un evento genético diferente (Wu et al., 2010).

Por otra parte, además de las alteraciones genéticas, durante el proceso de génesis y desarrollo los tumores oligodendrogliales pueden también experimentar modificaciones epigenéticas con impacto en la evolución tumoral (Campbell et al., 2008). A este respecto Kuo et al. (Kuo et al., 2009) apuntan que entre las alteraciones genéticas y epigenéticas con influencia pronóstica pueden darse interrelaciones que resulten en sinergias o efectos aditivos de unas sobre otras. Por ello los autores sostienen que el simple análisis molecular de la pérdida de heterocigosidad es claramente insuficiente para definir subgrupos de pacientes con pronóstico similar y defienden que, si se pretende obtener información con valor clínico real, deberá efectuarse un análisis genético pormenorizado y más detallado de estos tumores.

7. CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados confirman que la pérdida de heterocigosidad de *1p*, *19q* y *1p19q* se encuentra fuertemente asociada a la localización frontal en los tumores oligodendrogliales

Sin embargo, del mismo modo que no es posible predecir con fiabilidad absoluta el estado de *1p19q* basándose exclusivamente en la histología del tumor (Ueki et al., 2002), la asociación entre el perfil molecular y las características radiológicas presenta también importantes excepciones y por ello resulta improbable que en el futuro pueda llegarse a predecir el estado de *1p19q* basándose exclusivamente en aspectos radiológicos (Jenkinson et al., 2006; Wu et al., 2010), y se requieren series mayores para validar estos resultados preliminares.

El objetivo fundamental de clasificar los gliomas es definir subgrupos de pacientes con un pronóstico similar: por una parte aquel de los pacientes cuyos tumores seguirán un curso clínico benévolo, y por tanto en ellos el tratamiento complementario radio y quimioterápico podría demorarse; en segundo lugar, el grupo de pacientes cuyos tumores aun siendo anaplásicos y por tanto con un comportamiento más agresivo, responderán favorablemente a la quimioterapia; y por último, aquel grupo de pacientes cuyos tumores no responderán a las modalidades terapéuticas disponibles en la actualidad. Para alcanzar este objetivo además del análisis histológico e inmunohistoquímico convencional, el estudio genético-molecular de los tumores puede proporcionar información muy valiosa.

Los esfuerzos deben dirigirse por tanto hacia la utilización combinada de todos los recursos disponibles en cada centro particular (radiología, marcadores inmunohistoquímicos, aspectos clínicos y estudio genético).

CONCLUSIONES GENERALES

1. En los gliomas anaplásicos, el valor pronóstico y predictivo de la expresión de MGMT y/o de la metilación del promotor de *MGMT* continúa siendo controvertido, y es motivo de debate si su relevancia en el comportamiento biológico del tumor y en la evolución clínica de los pacientes es idéntica en los distintos subtipos histológicos de glioma anaplásico.

   Debido a que en la actualidad no se dispone de una alternativa terapéutica suficientemente contrastada para aquellos pacientes con tumores cuyo perfil molecular sugiere que no se beneficiarán del tratamiento quimioterápico estándar, la toma de decisiones en la práctica clínica no debe basarse por lo tanto en los resultados de este análisis.

2. No existe una buena concordancia entre los resultados de la determinación inmunohistoquímica de MGMT y los correspondientes al estado de metilación del promotor valorado mediante MSP, de modo que especialmente en los tumores cerebrales, el grado de expresión de la proteína MGMT no siempre refleja el estado de metilación del promotor de *MGMT* y viceversa, el estado de metilación del promotor de *MGMT* no siempre refleja el grado de expresión genética.

3. Con el objetivo fundamental de clasificar a los pacientes con diagnóstico de glioma anaplásico en subgrupos con un pronóstico similar, además del análisis histológico e inmunohistoquímico convencionales, el estudio genético-molecular de los tumores puede proporcionar información muy valiosa.

   La pérdida de heterocigosidad de *1p*, *19q* y *1p19q* se encuentra fuertemente asociada a la localización frontal en los tumores oligodendrogliales. Dada la asociación entre el perfil genético de los tumores oligodendrogliales y determinadas características radiológicas, los esfuerzos deben dirigirse hacia la utilización combinada de todos los recursos disponibles en cada centro particular (radiología, marcadores inmunohistoquímicos, aspectos clínicos y estudio genético).

Anexos

ANEXO I: ESCALA DE KARNOFSKY

(Karnofsky et al., 1948)

La Escala de Karnofsky (KPS) es la forma estándar de medir la capacidad para realizar las tareas rutinarias de los pacientes con cáncer. Los valores de la misma oscilan entre 0 y 100. A mayor puntuación mejor capacidad del paciente para realizar las actividades cotidianas. La KPS ha demostrado una clara influencia pronóstica en pacientes con gliomas de alto grado y es empleada en la práctica clínica diaria para la selección de pacientes tributarios de tratamiento complementario, para la inclusión o exclusión de un paciente en un determinado ensayo clínico, etc. También resulta útil en la evaluación del impacto de una intervención terapéutica.

Una puntuación de 50 o inferior indica elevado riesgo de muerte durante los 6 meses siguientes.

100: Normal, asintomático, sin indicios de enfermedad.

90: Capaz de realizar vida normal, pero con signos y síntomas leves de enfermedad.

80: Actividad normal con esfuerzo, con algunos signos y síntomas de enfermedad.

70: Capaz de cuidarse, pero incapaz de llevar a término actividades normales o trabajo activo.

60: Requiere atención ocasional, pero puede cuidar de sí mismo.

50: Requiere gran atención, incluso de tipo médico. Encamado menos del 50% del día.

40: Inválido, incapacitado, necesita cuidados y atenciones especiales. Encamado más del 50% del día.

30: Inválido grave, severamente incapacitado, tratamiento de soporte activo.

20: Encamado por completo, paciente muy grave, necesita hospitalización y tratamiento activo.

10: Moribundo.

0: Fallecido.

ANEXO II: CRITERIOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO PARA GLIOMAS MALIGNOS SUPRATENTORIALES DE MACDONALD Y COLS.

(Macdonald et al., 1990)

Respuesta	Criterios
Respuesta **completa**	Desaparición de toda la zona de realce de contraste en las TC o RM consecutivas realizadas al menos con 1 mes de intervalo de tiempo entre ellas, en un paciente sin tratamiento con corticoides y en una situación neurológica estable o mejorada
Respuesta **parcial**	Disminución del tamaño del tumor captante de contraste ≥ 50% en las TC o RM consecutivas y realizadas al menos con 1 mes de intervalo de tiempo entre ellas, en un paciente en tratamiento corticoideo a dosis estable o en descenso y en una situación neurológica estable o mejorada.
Enfermedad **en progresión**	Incremento del tamaño del tumor captante de contraste o de cualquier nueva lesión >25% en el TC o la RM, en un paciente en tratamiento corticoideo a dosis estable o en ascenso y en una situación neurológica en deterioro.
Enfermedad **estable**	El resto de las situaciones

ANEXO III :

MINI MENTAL STATE EXAMINATION (MMSE)

(Folstein et al., 1975, Lobo et al., 1979)

Nombre: Varón [ ] Mujer [ ]

Fecha: F. nacimiento: Edad:

Estudios/Profesión: N. Hª:

Observaciones:

¿En qué año estamos? **0-1** ¿En qué estación? **0-1** ¿En qué día (fecha)? **0-1** ¿En qué mes? **0-1** ¿En qué día de la semana? **0-1**	**ORIENTACIÓN TEMPORAL (Máx.5)**	
¿En qué hospital (o lugar) estamos? **0-1** ¿En qué piso (o planta, sala, servicio)? **0-1** ¿En qué pueblo (ciudad)? **0-1** ¿En qué provincia estamos? **0-1** ¿En qué país (o nación, autonomía)? **0-1**	**ORIENTACIÓN ESPACIAL (Máx.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)	**Nº de repeticiones necesarias** **FIJACIÓN-Recuerdo Inmediato (Máx.3)**	
Si tiene 30 pesetas y me va dando de tres en tres, ¿Cuántas 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 M0-1)	**ATENCIÓN CÁLCULO (Máx.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 (Máx.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 mano d. 0-1 dobla por 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 y pida al sujeto que los copie. Para otorgar un punto deben estar presentes los 10 ángulos y la intersección. 0-1	**LENGUAJE (Máx.9)**	
Puntuaciones de referencia: 27 ó más: normal 24 ó menos: sospecha patológica 12-24: deterioro 9-12 : demencia	**Puntuación Total (Máx.: 30 puntos)**	

ANEXO IV:

Evaluación QUADAS (Whiting et al, 2003)

The QUADAS tool				
Item		***Yes***	***No***	***Unclear***
1.	*Was the spectrum of patients representative of the patients who will receive the test in practice?*	( )	( )	( )
2.	*Were selection criteria clearly described?*	( )	( )	( )
3.	*Is the reference standard likely to correctly classify the target condition?*	( )	( )	( )
4.	*Is the time period between reference standard and index test short enough to be reasonably sure that the target condition did not change between the two tests?*	( )	( )	( )
5.	*Did the whole sample or a random selection of the sample, receive verification using a reference standard of diagnosis?*	( )	( )	( )
6.	*Did patients receive the same reference standard regardless of the index test result?*	( )	( )	( )
7.	*Was the reference standard independent of the index test (i.e. the index test did not form part of the reference standard)?*	( )	( )	( )
8.	*Was the execution of the index test described in sufficient detail to permit replication of the test?*	( )	( )	( )
9.	*Was the execution of the reference standard described in sufficient detail to permit its replication?*	( )	( )	( )
10.	*Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard?*	( )	( )	( )
11.	*Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test?*	( )	( )	( )
12.	*Were the same clinical data available when test results were interpreted as would be available when the test is used in practice?*	( )	( )	( )
13.	*Were uninterpretable/ intermediate test results reported?*	( )	( )	( )
14.	*Were withdrawals from the study explained?*	( )	( )	( )

ANEXO V:

Evaluación STARD (Bossuit et al, 2003)

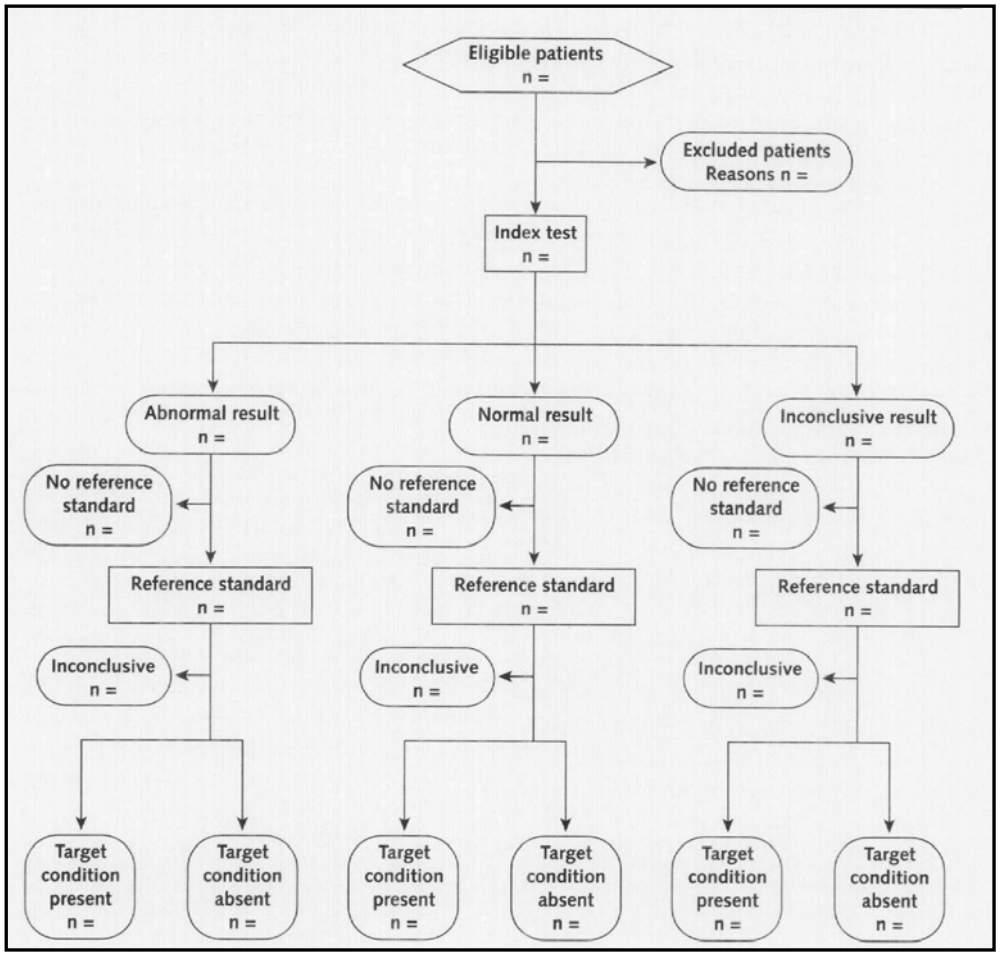
Table. STARD Checklist for the reporting of Studies of Diagnostic Accuracy

Section and Topic	***Item #***		***On page #***
TITLE/ABSTRACT/KEYWORDS	1	*Identify the article as study accuracy (recommend MeSH heading 'sensitivity and specificity').*	
INTRODUCTION	2	*State the research questions or study aims, such as estimating diagnostic accuracy or comparing accuracy between tests or across participant groups.*	
METHODS		*Describe*	
Participants	3	*The study population: The inclusion and exclusion criteria, setting and locations where the data were collected.*	
	4	*Participant recruitment: Was recruitment based on presenting symptoms, results from previous tests, or the fact that the participants had received the index tests or the reference standard?*	
	5	*Participant sampling: Was the study population a consecutive series of participants defined by the selection criteria in item 3 and 4? If not specify how participants were further selected.*	
	6	*Data collection. Was data collection planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)?*	
Test methods	7	*The reference standard and its rationale*	
	8	*Technical specifications of material and methods involved including how and when measurements were taken, and/or cite references for index tests and reference standard.*	
	9	*Definition and rationale for the units, cutoffs, and7or categories of the results of the index tests and the reference standard.*	
	10	*The number, training, and expertise of the persons executing and reading the index tests and the reference standard.*	
	11	*Whether or not the readers of the index tests and the reference standard were blind (masked) to the results of the other test and describe any*	

		other clinical information available to the readers.
Statistical methods	12	*Methods for calculating or comparing measures of diagnostic accuracy, and the statistical methods used to quantify uncertainty (e.g., 95% confidence intervals)*
	13	*Methods for calculating test reproducibility, if done.*
RESULTS		*Report*
Participants	14	*When study was done, including beginning and ending dates of recruitment.*
	15	*Clinical and demographic characteristics of the study population (e.g., age, sex, spectrum of presenting symptoms, comorbidity, current treatments, recruitment centres).*
	16	*The number of participants satisfying the criteria for inclusion that did or did not undergo the index test and/or the reference standard; describe why participants failed to receive either test (a flow diagram is strongly recommended).*
Test results	17	*The interval from the index tests to the reference standard, and any treatment administered between.*
	18	*Distribution of severity of disease (define criteria) in those with the target condition; other diagnoses in participants without the target condition.*
	19	*A cross tabulation of the results of the index tests (including indeterminate and missing results) by the results of the reference standard; for continuous results, the distribution of the test results by the results of the reference standard.*
	20	*Any adverse events from performing the index test or the reference standard.*
Estimates	21	*Estimates of diagnostic accuracy and measures of statistical uncertainty (e.g., 95% confidence intervals).*
	22	*How indeterminate results, missing responses, and outliers of the index test were handled.*
	23	*Estimates of variability of diagnostic accuracy between subgroups of participants, readers or centres, if done.*
	24	*Estimates of test reproducibility, if done.*
DISCUSSION	25	*Discuss clinical applicability of the study findings*

** MeSH = Medical Subject Headings; STARD = Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*

Diagrama de flujo característico de un estudio sobre precisión diagnóstica de un test.



ANEXO VI: ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INTRODUCCIÓN:

Tablas

Página

Tabla 1. Mortalidad por tumores del sistema nervioso central en España 22
Tabla 2.: Principales tipos de terapia local para tratamiento de los gliomas de alto grado 47
Tabla 3.: Series de gliomas anaplásicos 49
Tabla 4.: Clasificaciones histopatológicas 50

Figuras

Figura 1.: Distribución de los tumores primarios del SNC por subtipos histológicos 23
Figura 2.: Imágenes intraoperatorias de astrocitomas anaplásicos 26
Figura 3.: Alteraciones genéticas y secuencia de aparición en el tiempo de los astrocitomas 27
Figura 4.: Aspecto macroscópico de un oligodendroglioma anaplásico 30
Figura 5.: Traslocación 1p;19q 32
Figura 6.: Alteraciones genéticas y secuencia de aparición en el tiempo en astrocitomas 34
Figura 7.: Alteraciones genéticas y secuencia de aparición en el tiempo en oligodendrogliomas 37
Figura 8.: Algoritmo terapéutico para gliomas anaplásicos 39
Figura 9.: Algoritmo terapéutico para gliomas anaplásicos en recidiva 45
Figura 10.: O6-Metilguanina ADN metiltransferasa 61
Figura 11.: Inactivación de la transcripción genética por metilación de las islas CpG del promotor 64

Figura 12.: Fundamento de la MSP 67
Figura 13.: Mapas de delección de 1p estudiados por diversos autores 75

Capítulo I:

Tablas

Tabla I.1.: Variables incluidas. (Material y Métodos) 93
Tabla I.2.: Características clínicas, radiológicas y patológicas de la serie (Resultados) 95
Tabla I.3.: Correlación IHQ / MSP (Resultados) 99
Tabla I.4.: Características clinicopatológicas de los pacientes; relación con la expresión de MGMT y el estado de metilación del promotor (Resultados) 100
Tabla I.5.: Factores pronósticos de supervivencia global en la serie completa (Resultados) 103
Tabla I.6.: Factores pronósticos de supervivencia global en el subgrupo de pacientes que recibieron quimioterapia (Resultados) 104
Tabla I.7.: Factores pronósticos de supervivencia libre de progresión en la serie completa (Resultados) 106
Tabla I.8.: Factores pronósticos de supervivencia libre de progresión en el subgrupo de pacientes que recibieron quimioterapia (Resultados) 107
Tabla I.9.: Correlación entre metilación del promotor de MGMT y expresión de la proteína MGMT en series de la literatura (Discusión) 109
Tabla I.10.: Técnicas de laboratorio basadas en el análisis específico de metilación del ADN empleadas para el estudio de MGMT (Discusión) 127
Tabla I.11.: Influencia pronóstica de MGMT en tumores cerebrales (Discusión) 136
Tabla I.12.: Influencia pronóstica de MGMT en metástasis cerebrales y en otros tumores de la economía sistémica (Discusión) 144

Figuras

Figura I.1.: Expresión inmunohistoquímica (Resultados) 97
Figura I.2.: Metilación del promotor por MSP (Resultados) 98
Figura I.3.: Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global en la serie completa (Resultados) 101
Figura I.4.: Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global en el subgrupo de pacientes que recibieron quimioterapia (Resultados) 105
Figura I.5.: Hipótesis de Knudson (Discusión) 115
Figura I.6.: Mecanismos reguladores de la transcripción de *MGMT* (Discusión) 121
Figura I.7.: Técnicas de laboratorio más empleadas para el estudio de MGMT (Discusión) 125

Capítulo II:

Tablas

Tabla II.1.: Guías para las Revisiones Sistemáticas (Material y Métodos) 166
Tabla II.2.: Estrategia de búsqueda automatizada (Material y Métodos) 168
Tabla II.3.: Sesgos, fuentes de los mismos y consecuencias (Material y Métodos) ... 175
Tabla II.4.: Características de los estudios incluidos (Resultados) 184
Tabla II.5.: Características de los estudios incluidos (Resultados) 188
Tabla II.6.: Escala QUADAS (Resultados) 195
Tabla II.7.: Sensibilidad, Especificidad, LR y ORd para todos los estudios (Resultados) 201
Tabla II.8.: Metaregresión para todos los estudios (Resultados) 207
Tabla II.9.: Metaregresión para el subgrupo de estudios de análisis IHQ y valoración semicuantitativa (Resultados) 208
Tabla II.10.: Resumen de resultados (Resultados) 211

Tabla II.11.: Principales diferencias entre los Meta-análisis de ensayos clínicos randomizados y los Meta-análisis de estudios sobre precisión de test diagnósticos (Discusión) 223

Figuras

Figura II.1.: Búsqueda de evidencia y selección de artículos (Resultados) 183
Figura II.2.: Escala QUADAS (Resultados) 198
Figura II.3.: Gráficos de bosque para Sensibilidad y Especificidad (Resultados) 204
Figura II.4.: Curva ROC (Resultados) 205
Figura II.5.: ABC e índice Q* para los estudios de tumores cerebrales con valoración semicuantitativa (Resultados) 215
Figura II.6.: ABC e índice Q* para los estudios de tumores sistémicos con valoración semicuantitativa (Resultados) 216
Figura II.7.: ABC e índice Q* para los estudios de tumores cerebrales (Resultados) 217
Figura II.8: ABC e índice Q* para los estudios de tumores sistémicos (Resultados) 218
Figura II.9.: Gráfico de embudo para valoración del sesgo de publicación (Resultados) 219

Capítulo III:

Tablas

Tabla III.1.: Principales carácterísticas radiológicas y clínicas (Resultados) 251
Tabla III.2.: Correlación entre las características radiológicas analizadas y el perfil genético tumoral (Resultados) 254
Tabla III.3.: Análisis univariante para supervivencia global (gliomas anaplásicos) (Resultados) 265
Tabla III.4.: Análisis univariante para supervivencia libre de progresión (gliomas anaplásicos) (Resultados) 266

Tabla III.5.: Análisis multivariante para supervivencia global (gliomas anaplásicos) (Resultados) 267
Tabla III.6.: Análisis multivariante para supervivencia libre de progresión (gliomas anaplásicos) (Resultados) 267
Tabla III.7.: Análisis univariante para supervivencia global (oligoastrocitomas anaplásicos) (Resultados) 268
Tabla III.8.: Análisis univariante para supervivencia libre de progresión (oligoastrocitomas anaplásicos) (Resultados) 269
Tabla III.9.: Análisis multivariante para supervivencia global (oligoastrocitomas anaplásicos) (Resultados) 270
Tabla III.10.: Análisis multivariante para supervivencia libre de progresión (oligoastrocitomas anaplásicos) (Resultados) 270

Figuras

Figura III.1.: Características radiológicas analizadas (Material y Métodos) 246
Figura III.2.: Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global según el grado histológico (Resultados) 257
Figura III.3.: Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión según el grado histológico (Resultados) 258
Figura III.4.: Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global según las características radiológicas (Resultados) 259
Figura III.5.: Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global según el grado de resección (Resultados) 260
Figura III.6.: Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global según las manifestaciones clínicas y el subtipo histológico (Resultados) 261
Figura III.7.: Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global según el perfil genético (Resultados) 263
Figura III.8.: Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión según el perfil genético (Resultados) 264

Prognostic Significance of O^6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Determined by Promoter Hypermethylation and Immunohistochemical Expression in Anaplastic Gliomas

Marta Brell,[1] Avelina Tortosa,[4] Eugenia Verger,[5] Juan Miguel Gil,[2] Nuria Viñolas,[5] Salvador Villá,[2] Juan José Acebes,[1] Lluis Caral,[5] Teresa Pujol,[5] Isidro Ferrer,[3] Teresa Ribalta,[5] and Francesc Graus[5]

Abstract **Purpose:** Anaplastic gliomas constitute a heterogeneous group of tumors with different therapeutic responses to adjuvant chemotherapy with alkylating agents. O^6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), a DNA repair protein, is one of the implicated factors in glioma chemoresistance. The prognostic value of MGMT remains controversial due in part to the fact that previous published studies included heterogeneous groups of patients with different tumor grades. The aim of this study was to evaluate the prognostic significance of MGMT in patients with anaplastic glioma.

Experimental Design: Ninety-three patients with anaplastic glioma were analyzed for MGMT protein expression by immunohistochemistry. In addition, for those patients from whom a good yield of DNA was obtained (n = 40), *MGMT* promoter methylation profile was analyzed by methylation-specific PCR. MGMT prognostic significance was evaluated together with other well-known prognostic factors.

Results: Fifty-one tumors (54.8%) showed nuclear staining of MGMT. There was a trend towards longer overall survival for those patients with negative MGMT immunostaining (hazard ratio, 1.66; P = 0.066). In a secondary analysis including those patients who actually received chemotherapy (n = 72), the absence of MGMT expression was independently associated with better survival (hazard ratio, 2.12; P = 0.027). *MGMT* promoter methylation was observed in 50% of the analyzed tumors. No statistical correlation between MGMT expression and MGMT promoter hypermethylation was observed.

Conclusions: Unlike previous studies, we did not find a correlation between *MGMT* promoter methylation and survival. However, we observed a correlation between MGMT protein expression and survival in those patients who received chemotherapy thus suggesting that the absence of MGMT expression is a positive predictive marker in patients with anaplastic glioma.

Anaplastic gliomas (WHO grade 3) show a wide variability of clinical outcome. Despite optimal treatment, mainly consisting of gross total resection followed by radiotherapy and chemotherapy with alkylating agents (1), therapeutic response and survival times vary considerably. This fact suggests that a large number of factors, including patient, tumor, and treatment characteristics, may influence the outcome (2–4).

Alkylating agents cause cell death by forming cross-links between adjacent strands of DNA due to alkylation of the O^6 position of guanine. The cellular DNA repair protein O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) inhibits the cross-linking of double-stranded DNA by removing alkylating lesions (5–7). A direct relationship between MGMT activity and resistance to alkylating nitrosoureas and methylating agents (i.e., ionizing radiations) has been well documented in cell lines and xenografts derived from a variety of human tumors, including gliomas (8). Moreover, depletion of MGMT activity with the substrate analogue inhibitor O^6-benzylguanine increases the rate of cell death by alkylating nitrosoureas in human glioma-derived cell lines (9).

MGMT is ubiquitously expressed in normal human tissues, although its levels vary considerably between organs and individuals. Remarkably, MGMT activity is usually higher in malignant tissues than in their normal counterparts (6, 10). However, tumors have long been noted to be heterogeneous with respect to MGMT expression; interestingly, in a subset of cancer cells, its expression is silenced mostly due to abnormal promoter methylation (7, 10–12). Among human neoplasms,

Authors' Affiliations: Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, [1]Hospital Universitari de Bellvitge, [2]Institut Català d'Oncologia, [3]Institut de Neuropatología, [4]Universitat de Barcelona, Departament d'Infermeria Fonamental, L'Hospitalet de Llobregat, and [5]Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 2/1/05; revised 3/16/05; accepted 5/3/05.

Grant support: "Red temática del cancer, Instituto Carlos III", Spain grant C03/10; "Red CIEN, Instituto Carlos III", Spain grant C03/6; and "Ministerio de Sanidad", Spain grant FIS 00/199 .

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Avelina Tortosa, Universitat de Barcelona, Escola Universitària d'Infermeria, Campus de Bellvitge, C/ Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Phone: 34-934024221; Fax: 34-934024216; E-mail: atortosa@ub.edu.

©2005 American Association for Cancer Research.

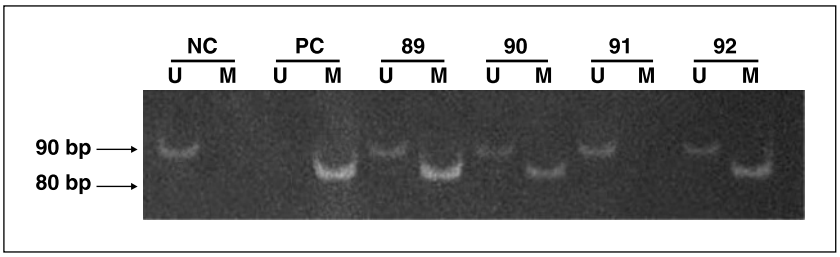


Fig. 1. Methylation-specific PCR of *MGMT* promoter in grade 3 (WHO) gliomas. One tumor sample (91) was unmethylated and three samples (89, 90, and 92) were methylated, although they showed both methylated and unmethylated bands. U, PCR product amplified by unmethylated-specific primers; M, PCR product amplified by methylated-specific primers; NC, normal control; PC, positive control.

gliomas present a high frequency of *MGMT* inactivation by promoter hypermethylation, occurring in almost 30% of them (6, 13, 14).

Some clinical studies suggest that MGMT inactivation by aberrant promoter methylation correlates with sensitivity to methylating agents in gliomas (15) and, eventually, to an improved prognosis (16–19). However, other clinical studies failed to show any relationship between *MGMT* methylation status and overall survival or response to alkylating agents in patients with gliomas (20–23). These contradictory results could be due to the fact that most previous studies evaluated heterogeneous groups of patients, including both those with anaplastic glioma and glioblastomas multiforme (7, 12, 16, 17, 20, 22–28). Because of the different biological behavior of these two types of tumors and the lower incidence of the former, it is plausible that the real benefit of the absence of MGMT in anaplastic gliomas was masked. In that sense, it is important to point out that although malignant, anaplastic gliomas have a better prognosis and a higher likelihood of response to chemotherapy than glioblastomas. Accordingly, only patients with histologic diagnosis of anaplastic glioma were included in the present study.

There are very few data concerning the correlation between *MGMT* promoter methylation and MGMT protein expression in gliomas, and contradictory results have also been reported (6, 29). Similarly, there are a limited number of reports using immunohistochemistry for the detection of MGMT in gliomas (23, 27, 30). Immunohistochemistry is a simple method for the detection of MGMT protein expression and it can be easily done even on archival paraffin-embedded

Table 1. Characteristics of patients with anaplastic glioma in relation to tumor MGMT expression and *MGMT* promoter methylation

Variable	MGMT protein expression (*n* = 93), *n* (%)			MGMT promoter methylation status (*n* = 40), *n* (%)		
	Positive (*n* = 51)	Negative (*n* = 42)	*P*	Methylated (n = 20)	Unmethylated (*n* = 20)	*P*
Age (y)						
≤48	30 (58.8)	17 (40.5)	0.078	11 (55)	14 (70)	0.327
>48	21 (41.2)	25 (59.5)		9 (45)	6 (30)	
Gender						
Male	30 (59.0)	30 (71.4)	0.206	7 (35)	16 (80)	0.004
Female	21 (41.0)	12 (28.6)		13 (65)	4 (20)	
Postoperative KPS						
<80	17 (33.4)	21 (50.0)	0.104	9 (45)	4 (20)	0.091
≥80	34 (66.6)	21 (50.0)		11 (55)	16 (80)	
Histology						
AA	41 (80.4)	34 (81.0)	0.946	18 (90)	14 (70)	0.235
AO, AOA	10 (19.6)	8 (19.0)		2 (10)	6 (30)	
Ki-67						
≤4.8%	30 (59.0)	18 (43.0)	0.125	12 (60)	12 (60)	1.000
>4.8%	21 (41.0)	24 (57.0)		8 (40)	8 (40)	
Ring enhancement						
No	32 (62.7)	26 (62.0)	0.934	10 (50)	15 (75)	0.102
Yes	19 (37.3)	16 (38.0)		10 (50)	5 (25)	
Extent of resection						
Gross total resection	20 (39.2)	14 (33.4)	0.558	9 (45)	8 (40)	0.749
Subtotal and biopsy	31 (60.8)	28 (66.6)		11 (55)	12 (60)	
Chemotherapy						
Yes	42 (82.4)	30 (71.4)	0.210	16 (80)	20 (100)	0.106
No	9 (17.6)	12 (28.6)		4 (20)	0 (0)	

Abbreviations: AA, anaplastic astrocytoma; AO, anaplastic oligoastrocytoma; OAA, anaplastic oligoastrocytoma.

specimens without using sophisticated equipment. In addition, it allows for the evaluation not only of the degree of staining but also the localization of the target factor in individual cells.

Taking into account all the above-mentioned considerations, the aim of this study was to evaluate the prognostic significance of MGMT in patients with anaplastic glioma. For this purpose, both *MGMT* promoter methylation and protein expression were analyzed in a series of patients with newly diagnosed WHO grade 3 glioma and managed according to a common diagnostic and therapeutic protocol.

Patients and Methods

Patients and tissue collection. Ninety-three patients admitted to the Neurosurgical Departments of Bellvitge Hospital and Hospital Clinic of Barcelona, between January 1993 and December 2001, were included. Seventy-two of these patients were reported in a previous study in which clinical prognostic factors were evaluated (4). Tumor samples were obtained during surgical treatment, formalin-fixed and paraffin-embedded for histologic studies and, in some cases, frozen and stored at −80°C until processing. Sixty patients were males (64.5%) and the median age was 48 years (range, 16-74). Sixty-two patients (66.7%) underwent resective surgery (34 gross total resection and 28 partial resection) and 31 patients (33.3%) biopsy. All tumors were histologically verified by two independent neuropathologists (IF, TR) and classified according to WHO (2). Seventy-five patients (80.6%) had anaplastic astrocytoma, whereas 18 (19.4%) had tumors with an oligodendroglial component (4 anaplastic oligodendroglioma and 14 anaplastic oligoastrocytoma). Informed written consent was obtained from all patients, and tissue collection was approved by each Institutional Review Board.

Patients were managed according to a previously established common diagnostic and therapeutic protocol, including adjuvant radiotherapy and chemotherapy after surgical resection. Radiotherapy consisted of focal cranial irradiation with a margin on the order of 2 to 3 cm surrounding the tumor volume. A high-energy and rigid immobilization system was used, and a dose of 60 Gy was given in standard daily fractions of 2 Gy. Chemotherapy consisted of carmustine [1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea] for patients with anaplastic astrocytoma, or the PCV regimen (procarbazine, lomustine, and vincristine) for those with tumors with oligodendroglial component. All patients received radiotherapy, but 21 of them (22.6%) did not receive chemotherapy because of disease progression and severe clinical deterioration during radiotherapy (n = 19), or rejection of treatment (n = 2). Tumor response was evaluated by cranial magnetic resonance imaging (MRI) and classified according to Macdonald's criteria (31). Patient follow-up was obtained using clinical chart review and was approved by the various institutional review boards.

Table 2. Predictors of overall survival and progression-free survival in the whole series (n = 93)

Variable	Overall survival				Progression-free survival			
	Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Hazard ratio* (95% CI)	*P*	Hazard ratio* (95% CI)	*P*	Hazard ratio* (95% CI)	*P*	Hazard ratio* (95% CI)	*P*
Age (y)								
≤48	2.204 (1.328-3.658)	0.002	—	NS	1.947 (1.138-3.333)	0.015	—	NS
>48	1†				1†			
Postoperative KPS								
≥80	3.444 (2.090-5.677)	0.000	3.066 (1.825-5.153)	0.000	2.723 (1.601-4.631)	0.000	2.399 (1.380-4.170)	0.002
<80	1†		1†		1†		1†	
Oligodendroglial component								
Yes	1.806 (0.915-3.567)	0.089	—	NS	2.771 (1.184-6.484)	0.019	3.044 (1.211-7.653)	0.018
No	1†				1†		1†	
Ki-67								
≤4.8%	3.359 (1.978-5.705)	0.000	3.198 (1.820-5.620)	0.000	3.448 (1.961-6.063)	0.000	3.016 (1.684-5.403)	0.000
>4.8%	1†		1†		1†		1†	
Ring enhancement								
No	2.475 (1.498-4.089)	0.000	2.122 (1.270-3.547)	0.004	2.701 (1.578-4.622)	0.000	1.842 (1.047-3.242)	0.034
Yes	1†		1†		1†		1†	
Gross total resection								
Yes	2.906 (1.636-5.161)	0.000	3.024 (1.655-5.525)	0.000	2.559 (1.405-4.661)	0.002	3.146 (1.657-5.975)	0.000
No	1†		1†		1†		1†	
MGMT expression								
Negative	1.192 (0.729-1.947)	0.484	1.666 (0.968-2.868)	0.066	1.179 (0.697-1.995)	0.538	—	NS
Positive	1†		1†		1†			
MGMT promoter status								
Methylated	1.469 (0.657-3.283)	0.349	—	NS	1.485 (0.641-3.439)	0.850	—	NS
Unmethylated	1†				1†			

Abbreviations: CI, confidence interval; NS, not significant.
*Hazard Ratio of being alive.
†Reference group.

Immunohistochemistry procedures. Immunohistochemistry was carried out following the streptavidin-biotin-peroxidase (LSAB) method (DAKO LSAB2 System, Peroxidase; DAKO, Carpinteria, CA) according to a previous published protocol (4). The mouse monoclonal antibody (MGMT Ab-1; clone MT 3.1, Neomarker, Westinghouse, Fremont, CA) was diluted 1:20 and the mouse Ki-67 antibody (DAKO) was used at a dilution of 1:25. Sections were slightly counterstained with hematoxylin. For MGMT immunohistochemistry, human liver was used as positive control and tonsil tissue served as positive control for Ki-67 antibody. Negative controls were done omitting the primary antibody.

Each slide was individually reviewed and scored by two observers (MB, AT). Fifteen to 20 fields at ×400 magnification were analyzed per specimen. The immunoreactivity of MGMT protein was evaluated semiquantitatively by estimating the fraction of positive cells and a level <5% was regarded as negative, 5% to 25% as low reactivity, 25% to 50% as moderate reactivity, and >50% as high reactivity. Only nuclear staining was considered for grading. Ki-67 scoring was accomplished by determining the percentage of positive nuclei from regions of maximal nuclear staining after counting 1,000 tumor cells, or as many cells as possible in the case of small specimens at ×400 magnification. Cells were counted as Ki-67 positive if diffuse nuclear staining was present. All immunohistochemical analysis was carried out blind to the clinical information.

Methylation-specific PCR. Genomic DNA was isolated from paraffin embedded samples and, when possible, from frozen tumor. DNA methylation status of CpG islands at the *MGMT* promoter was determined by methylation-specific PCR (MSP) as previously described (6), with some modifications. For PCR amplification, previous reported specific primer sequences were used: 5′-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3′ (forward primer) and 5′-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3′ (reverse primer) for the unmethylated reaction and 5′-TTTCGACGTTCGTAGGTTTTCGC-3′ (forward primer) and 5′-CGACTCTTCCGAAAACGAAACG-3′ (reverse primer) for the methylated reaction (17). The annealing temperature was 59°C. All reactions were done twice to exclude unspecific PCR amplifications. Low-quality DNA yielding uncertain PCR results was discarded. Normal human lymphocyte DNA was used as negative control for methylated alleles of MGMT, and Placental DNA treated *in vitro* with *Sss*I methyltransferase (New England Biolabs, Beverly, MA) was used as positive control. Controls without DNA were used for each set of MSP assay. PCR products were separated on 8% polyacrylamide gels, stained with ethidium bromide, and examined under UV illumination. Investigators doing these assays were blinded to clinical information.

Statistical methods. The relationship between tumor MGMT expression and MSP results, as well as their correlation with clinicopathologic variables, were evaluated by the χ^2 and the Fisher's exact test. The length of follow-up was described as the median and

Table 3. Predictors of overall survival and progression-free survival in the subgroup of patients who received chemotherapy (n = 72)

Variable	Overall survival				Progression-free survival			
	Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Univariate analysis	
	Hazard ratio* (95% CI)	*P*	Hazard ratio* (95% CI)	*P*	Hazard ratio* (95% CI)	*P*	Hazard ratio* (95% CI)	*P*
Age (y)								
≤48	2.189 (1.221-3.924)	0.009	—	NS	1.868 (1.012-3.451)	0.046	—	NS
>48	1†				1†			
Postoperative KPS								
≥80	2.924 (1.641-5.209)	0.000	2.454 (1.346-4.473)	0.003	2.269 (1.224-4.205)	0.009	—	NS
<80	1†		1†		1†			
Oligodendroglial component								
Yes	2.220 (0.986-4.996)	0.054	2.275 (0.957-5.433)	0.064	3.644 (1.294-10.258)	0.014	5.339 (1.806-15.779)	0.002
No	1†		1†		1†		1†	
Ki-67								
≤4.8%	3.989 (2.127-7.481)	0.000	3.761 (1.889-7.487)	0.000	3.886 (2.022-7.471)	0.000	3.766 (1.942-7.302)	0.000
>4.8%	1†		1†		1†		1†	
Ring enhancement								
No	2.343 (1.296-4.233)	0.005	1.844 (0.981-3.466)	0.057	2.785 (1.496-5.186)	0.001	—	NS
Yes	1†		1†		1†			
Gross total resection								
Yes	2.831 (1.483-5.404)	0.002	3.918 (1.947-7.881)	0.000	2.388 (1.232-4.627)	0.010	4.049 (1.999-8.201)	0.000
No	1†		1†		1†		1†	
MGMT expression								
Negative	1.057 (0.595-1.880)	0.849	2.121 (1.107-4.065)	0.023	1.050 (0.570-1.936)	0.875	—	NS
Positive	1†		1†		1†			
MGMT promoter status								
Methylated	1.333 (0.565-3.143)	0.512	—	NS	1.317 (0.535-3.243)	0.550	—	NS
Unmethylated	1†				1†			

Abbreviations: CI, confidence interval; NS, not significant.
*Hazard Ratio of being alive.
†Reference group.

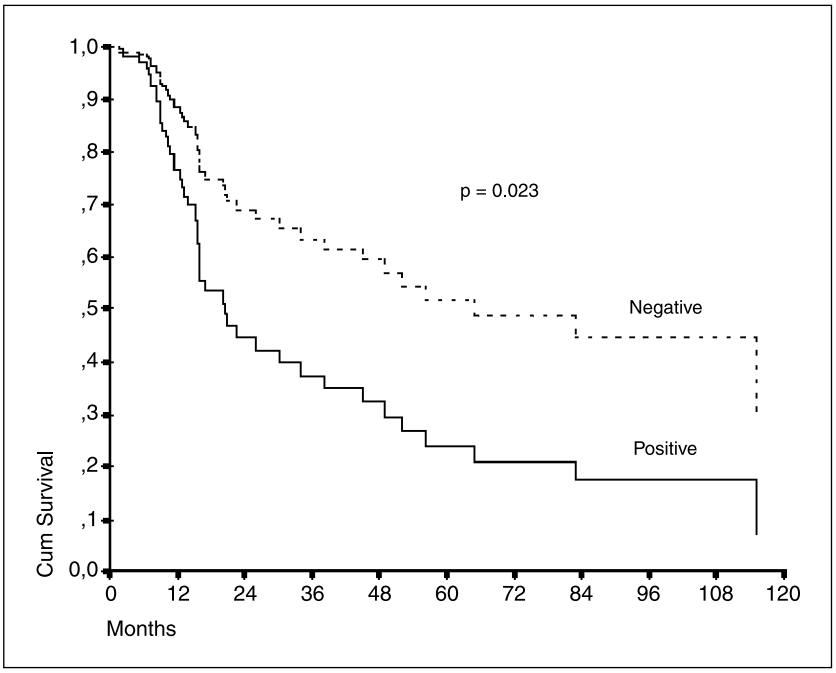


Fig. 2. Overall survival curve of patients receiving chemotherapy (n = 72) according to MGMT protein expression.

range. The effect of single variables on overall survival and progression-free survival was determined by both univariate and multivariate analyses. Overall survival was calculated from surgery to the date of death or last follow-up visit. Progression-free survival was counted from surgery to the date of tumor relapse or progression. Probabilities of overall survival and progression-free survival were calculated according to the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test. Tumor MGMT expression and *MGMT* promoter methylation status, along with demographic (age and gender), clinical (postoperative Karnofsky Performance Status [KPS]), radiological (ring enhancement), pathologic (presence of oligodendroglial component and proliferative index), and therapeutic (extent of resection) variables achieving a $P < 0.2$ in the univariate analysis, were subsequently introduced in a backward stepwise proportional hazard analysis (Cox model) to identify independent predictors of survival. For continuous variables, the cutoff level chosen was their median value. MGMT immunohistochemistry was reclassified as negative and positive (including low, moderate, and high staining) for statistical purposes. To minimize any potential bias, patients who did not adhere to the established treatment protocol were not excluded from the analysis (32). Nevertheless, a second analysis including those patients receiving adjuvant chemotherapy was also done. All statistical analysis was done at a significance level of P = 0.05, using the statistical package SPSS 11.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Results

MGMT protein expression and MGMT promoter methylation status. MGMT positive immunostaining was detected in 51 tumors (54.8%). Nineteen tumors showed low, 20 moderate, and 12 high MGMT immunoreactivity. In all positive tumor samples, heterogenous immunostaining was observed; areas with complete loss of MGMT expression alternated with areas of scattered or clustered cells with strong immunoreactivity.

After specific MSP, DNA was correctly amplified in 40 out of all analyzed samples. These 40 cases did not statistically differ from the rest of the series in any of the evaluated variables (data not shown). *MGMT* promoter hypermethylation was detected in 20 of these 40 patients (50%). In all methylated samples, signals of unmethylated DNA were also present (Fig. 1).

In four patients, tumors showed lack of MGMT protein expression and promoter methylation, and 13 tumors with unmethylated profile showed MGMT immunoreactivity. However, in 16 cases in which *MGMT* promoter was aberrantly methylated, some degree of MGMT immunoreactivity was detected. In addition, seven cases with complete loss of MGMT expression lacked *MGMT* promoter hypermethylation. Accordingly, no correlation between MGMT protein expression and *MGMT* promoter methylation was observed (P = 0.29).

Neither MGMT protein expression nor *MGMT* promoter methylation status were related to any clinicopathologic variables, except for gender, for which the incidence of unmethylated tumors was found significantly associated to male gender (P = 0.004). Importantly, no differences were observed in either MGMT protein expression or promoter methylation status with respect to adjuvant chemotherapy (Table 1).

Overall survival. After a median follow-up of 89.7 months (range, 28-131), 28 patients (30.1%) remained alive. Median survival was 18 months (range, 1.6-131). In the univariate analysis, factors influencing overall survival were age, postoperative KPS, proliferative index, contrast enhancement on MRI, and extent of resection. There was a trend toward a longer overall survival for those patients whose tumors had an oligodendroglial component. The Cox's regression model revealed that postoperative KPS of ≥80, proliferative index of ≤4.8%, absence of contrast enhancement, and gross total resection were independently associated with a longer survival. Lack of MGMT immunoreactivity showed a tendency to an increased overall survival (Table 2). Finally, when a second analysis including only those patients that were actually treated

Table 4. Prognostic significance of MGMT reported in the literature

Author/year	*n*[*]	Histology	Method	Effect of methylated promoter/low mRNA/absent protein expression on survival[†]		Independent predictor on multivariate analysis
				Progression-free survival	Overall survival	
Mineura et al. 1996 (20)	11	6 GBM, 8 AA, 4 LGG	RT-PCR	Yes	NS	no
Belanich et al. 1996 (24)	167	99 GBM, 47 AA, 21 others	Quantitative immunofluorescence	Yes[‡]	Yes[‡]	yes
Jaeckle et al. 1998 (7)	64	40 GBM, 24 AA	Quantitative immunofluorescence	Yes	Yes[§]	no
Rolhion et al. 1999 (21)	39	GBM	RT-PCR	NS	NS	no
Silber et al. 1999 (25)	174	83 GBM, 23 AA, 68 LGG	MGMT activity	NS	—	no
Chen et al. 1999 (26)	22	13 GBM, 9 AA	Quantitative immunofluorescence	NS	NS	no
Esteller et al. 2000 (17)	47	29 GBM, 18 AA	MSP	Yes	Yes	no
Anda et al. 2003 (27)	18	GBM	Immunohistochemistry	NS	Yes	no
Tanaka et al. 2003 (12)	100	41 GBM, 28 AA, 19 LGG, 12 others	RT-PCR	—	Yes[‖]	yes
Komine et al. 2003 (34)	64	LGG	MSP	Yes[¶]	Yes[¶]	yes
Balaña et al. 2003 (19)	21	GBM	MSP	Yes	—	no
Paz et al. 2004 (22)	92	51 GBM, 20 AO, 16 AA, 5 AOA	MSP	NS	NS[**]	no
Hegi et al. 2004 (18)	38	GBM	MSP	—	Yes[††]	yes
Andersson et al. 2004 (23)	34	GBM, AA, AO, LGG	Immunohistochemistry	—	NS	no
Blanc et al. 2004 (33)	44	GBM	MSP	NS	NS	no
Kamiryo et al. 2004 (16)	116	74 GBM, 42 AA	MSP	Yes[‡‡]	Yes[‡‡]	yes
Watanabe et al. 2004 (28)	45	29 GBM, 16 AA	MSP	Yes[§§]	Yes[§§]	yes
Nakasu et al. 2004 (30)	51	High grade glioma	Immunohistochemistry	—	Yes	yes
Present series	93	75AA, 18AO&AOA	MSP	NS	NS	yes
			Immunohistochemistry	NS	Yes[‖‖]	yes

Abbreviations: NS, not significant; GBM, glioblastoma multiforme; AA, anaplastic astrocytoma; AO, anaplastic oligodendroglioma; AOA, anaplastic oligoastrocytoma; LGG, low-grade glioma.

[*] Number of specimens.

[†] Only statistically significant results ($P < 0.05$) are considered (—, not stated data).

[‡] Differences statistically significant for the whole series and GBM; Nonsignificant for AA.

[§] Differences statistically significant for patients ages <60 years; Nonsignificant at greater than this age.

[‖] Differences statistically significant in the univariate analysis; Nonsignificant by multivariate logistic regression analysis.

[¶] MGMT promoter methylation correlates with poor prognosis; Differences statistically significant in the univariate and multivariate analyses for PFS, only statistically significant in the univariate for OS.

[**] Although nonsignificant, there was a trend toward better outcome in those gliomas with methylated MGMT except for AA or AOA.

[††] Differences statistically significant in the univariate and multivariate analyses.

[‡‡] Differences statistically significant in the univariate and multivariate analyses for AA; Nonsignificant for GBM.

[§§] Differences statistically significant for GBM. Nonsignificant for AA.

[‖‖] Differences statistically significant for patients who received chemotherapy.

with adjuvant chemotherapy (n = 72) was done, the absence of MGMT immunostaining was identified as an independent prognostic factor, along with postoperative KPS of ≥80, proliferative index of ≤4.8%, and gross total resection (Table 3; Fig. 2).

Progression-free survival. At the end of follow-up, 34 patients (36.6%) remained free of progression. Statistically significant prognostic factors on the univariate analysis were age, postoperative KPS, proliferative index, presence of an oligodendroglial component, absence of contrast enhancement on MRI, and extent of resection. As shown in Table 2, the multivariate analysis showed that postoperative KPS of ≥80, presence of an oligodendroglial component, proliferative index of ≤4.8%, absence of contrast enhancement on MRI, and gross total resection were independently associated with longer progression-free survival. When a secondary analysis of patients receiving adjuvant chemotherapy was done, MGMT expression was not independently associated with progression-free survival (Table 3).

Discussion

This study represents, to our knowledge, the first investigation aimed at evaluating the prognostic significance of MGMT in a series of patients with newly diagnosed WHO grade 3 gliomas uniformly treated, in which both tumor MGMT expression and *MGMT* promoter methylation status were simultaneously evaluated. Our results show that absence of tumor MGMT expression is independently associated with a longer overall survival in patients with anaplastic gliomas who received adjuvant chemotherapy, whereas aberrant *MGMT* promoter methylation has no prognostic implications. The strength of these results relies mainly on the fact that MGMT predictive value has been evaluated after adjusting this variable for well-recognized clinicopathologic prognostic factors.

The proportion of tumors exhibiting either lack of MGMT protein immunoreactivity or *MGMT* promoter hypermethylation did not differ from previously reported studies (6, 8, 16–19, 22, 27, 33–39). However, in the present study, there was an inconsistent correlation between aberrant promoter methylation and loss of protein expression. Very few studies have investigated the relationship between *MGMT* promoter hypermethylation and protein expression in gliomas and contradictory results were observed (6, 38, 40). Moreover, this inconsistency was also observed in other neoplasms (39, 41) and was not limited to the *MGMT* gene (42–44). Whereas methylation is clearly involved in the inactivation of *MGMT* gene in numerous tumors and cancer cell lines (5, 6, 8, 11, 36), regulation of MGMT expression is a more complex phenomenon in which abnormal methylation of the promoter is not the only determining factor (5, 38, 39, 41, 45, 46). Indeed, several studies indicate that grade of methylation both in the promoter region and in neighboring sequences may regulate gene expression (40, 43, 46, 47). Furthermore, MSP is a highly sensitive qualitative technique in which a methylated band may be observed even if cells that carry *MGMT* promoter hypermethylation represent only a minor portion of the tumor (5).

A heterogeneous pattern of MGMT immunoreactivity was observed among different regions of the same tumor, ranging from no immunostaining to strong immunoexpression. Differences in the methylation status of the *MGMT* promoter in tumor cell subpopulations may explain this heterogeneity. In fact, most of the methylated tumors in the present study also exhibited a profile of unmethylation. Whereas the presence of contaminating normal cells may not be ruled out (6), other potential explanations for this variability include monoallelic promoter methylation, methylation of a small proportion of malignant cells or loss of heterozygosity in 10q26 (33, 36, 38, 44).

The influence of *MGMT* promoter methylation status and MGMT protein expression on the prognosis of patients with gliomas has been evaluated in several studies with contradictory results (Table 4). Most previously published data were obtained from heterogeneous groups of patients with different grades and histologies, each with its own natural course and treatment response. In addition, many of these studies included distinct treatment protocols. Some studies have shown that *MGMT* promoter methylation is associated with improved time to progression or overall survival, either in the whole series or in subset analyses (16–19). Conversely, other investigators have found that median progression-free survival was longer in patients with unmethylated gliomas (34), whereas no association between *MGMT* methylation and prognosis was reported (22, 33). In the present study, we also failed to show this correlation, although we could not definitively ruled out the absence of prognostic value of aberrant *MGMT* promoter because of the relative low number of specimens analyzed. With respect to tumor MGMT protein expression determined by immunohistochemistry or quantitative immunofluorescence, results are also contradictory (7, 23, 24, 27). Although differences in the study designs could explain, at least in part, these contradictory results, other possibilities should be considered. In that sense, the observation of a longer survival in patients receiving chemotherapy whose tumors did not express MGMT may reflect a difficulty of cancer cells in correcting DNA damage induced by chemotherapy, thus leading them to death. On the other hand, loss of MGMT expression could also be a negative prognostic factor because of an increased susceptibility to acquiring other mutations (48–50). Finally, it is important to keep in mind that hypermethylation can simultaneously occur in other genes with a CpG island in their promoter regions (51), making it more difficult to predict the final behavior of tumor cells.

The prognostic significance of MGMT protein expression or *MGMT* promoter methylation in glioma patients will remain controversial. The marked heterogeneity in survival among patients with anaplastic glioma is probably not related to the function of a single gene. In that sense, consideration of MGMT as the only relevant molecular factor in tumor chemosensitivity may constitute an oversimplification, because it would imply that two groups of tumors (MGMT positive and negative) are otherwise very similar. Further clinical studies are needed to clarify whether MGMT discriminates among biologically distinct groups of tumors each with a different natural history and response to treatment.

Acknowledgments

We thank T. Yohannan for editorial assistance.

References

1. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomized trials. Lancet 2002; 359:1011–8.
2. Cavenee WK, Furnari FB, Nagane M, et al. Astrocytic tumors. In: Kleihues P, Cavenee WK, editors. Pathology and genetics. Tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press; 2000. p. 27–9.
3. Buckner JC. Factors influencing survival in high-grade gliomas. Semin Oncol 2003;30:10–4.
4. Tortosa A, Viñolas N, Villà S, et al. Prognostic implication of clinical, radiologic, and pathologic features in patients with anaplastic gliomas. Cancer 2003;97: 1063–71.
5. Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH. Inactivation of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. Br J Cancer 2002;86:1888–92.
6. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O^6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. Cancer Res 1999;59:793–7.
7. Jaeckle KA, Eyre HJ, Townsend JJ, et al. Correlation of tumor O^6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. J Clin Oncol 1998;16:3310–5.
8. Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC. Structure, function, and inhibition of O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1995; 51:167–223.
9. Bobola MS, Berger MS, Silber JR. Contribution of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase to resistance to 1,3-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in human brain tumor-derived cell lines. Mol Carcinog 1995; 13:81–8.
10. Silber JR, Mueller BA, Ewers TG, Berger MS. Comparison of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in brain tumors and adjacent normal brain. Cancer Res 1993;53:3416–20.
11. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetic joins genetics. Trends Genet 2000;16:168–73.
12. Tanaka S, Kobayahi I, Utsuki S, et al. O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in gliomas by means of real-time quantitative RT-PCR and clinical response to nitrosoureas. Int J Cancer 2003; 103:67–72.
13. Silber JR, Bobola MS, Ghatan S, Douglas AB, Kolstoe DD, Berger M. O^6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics. Cancer Res 1998; 58:1068–73.
14. Weinstein JN. Pharmacogenomics: teaching old drugs new tricks. N Engl J Med 2000;343:1408–9.
15. Paz MF, Fraga MF, Avila S, et al. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. Cancer Res 2003;63:1114–21.
16. Kamiryo T, Tada K, Shiraishi S, Shinojima N, Kochi M, Ushio Y. Correlation between promoter hypermethylation of the O^6- methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase gene and prognosis in patients with high-grade astrocytic tumors treated with surgery, radiotherapy, and 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-based chemotherapy. Neurosurgery 2004;52:349–57.
17. Esteller M, García-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. N Engl J Med 2000;343:1350–4.
18. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O^6-metylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with Temozolamide. Clin Cancer Res 2004;10:1871–4.
19. Balaña C, Ramirez JL, Taron M, et al. O^6-methylguanine-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;9:1461–8.
20. Mineura K, Yanagisawa T, Watanabe K, Kowada M, Yasui N. Human brain tumor O^6-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA and its significance as an indicator of selective chloroethylnitrosourea chemotherapy. Int J Cancer 1996;69:420–5.
21. Rolhion C, Penault-Llorca F, Kemeny JL, et al. O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) expression in human glioblastomas in relation to patient characteristics and p53 accumulation. Int J Cancer 1999;416:416–20.
22. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to Temozolamide in primary gliomas. Clin Cancer Res 2004;10:4933–8.
23. Andersson U, Malmer B, Bergenheim AT, Brännström T, Henriksson R. Heterogeneity in the expression of markers for drug resistance in brain tumors. Clin Neuropathol 2004;23:21–7.
24. Belanich M, Pastor M, Randall T, et al. Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. Cancer Res 1996; 56:783–8.
25. Silber JR, Blank A, Bobola MS, Ghatan S, Kolstoe DD, Berger MS. O^6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient phenotype in human gliomas: frequency and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy. Clin. Cancer Res 1999; 5:807–14.
26. Chen ZP, Yarosh D, Garcia Y, et al. Relationship between O^6-methylguanine DNA methyltransferase levels and clinical response induced by chloroethylnitrosourea therapy in glioma patients. Can J Neurol Sci 1999;26:104–9.
27. Anda T, Shabani HK, Tsunoda K, et al. Relationship between expression of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione-*S*-transferase π in glioblastoma and the survival of the patients treated with nimustine hydrochloride: an immunohistochemical analysis. Neurol Res 2003;25:241–8.
28. Watanabe T, Katayama Y, Komine C, et al. O^6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course. Int J Cancer 2004;113:581–7.
29. Möllemann 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;113:379–85.
30. Nakasu S, Fukami T, Baba K, Matsuda M. Immunohistochemical study for O^6-methylguanine-DNA methyltransferase in the non-neoplastic and neoplastic components of gliomas. J Neurooncol 2004;70: 333–40.
31. Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC Jr, Cairncross JG. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. J Clin Oncol 1990; 8:1277–80.
32. Montori VM, Guyatt GH. Intention-to-treat principle. Can Med Assoc J 2001;165:1339–41.
33. Blanc JL, Wager M, Guilhot J, et al. Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. J Neurooncol 2004;68: 275–83.
34. Komine C, Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yokoyama T, Fukushima T. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O^6-methylguanine-DNA methyltransferase is an independent predictor of shortened progression free survival in patients with low-grade diffuse astrocytomas. Brain Pathol 2003;13:176–84.
35. Lee SM, Reid H, Elder RH, Thatcher N, Margison GP. Inter- and intracellular heterogeneity of O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase expression in human brain tumors: possible significance in nitrosourea therapy. Carcinogenesis 1996;17:637–41.
36. Margison GP, Povey AC, Kaina B, Santibáñez Korel MF. Variability and regulation of O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. Carcinogenesis 2003;24:625–35.
37. Ma S, Egyházi S, Ueno T, et al. O^6-methylguanine-DNA methyltransferase expression and gene polymorphisms in relation to chemotherapeutic response in metastatic melanoma. Br J Cancer 2003;89:1517–23.
38. Rood BR, Zhang H, Cogen PH. Intercellular heterogeneity of expression of the MGMT DNA repair gene in pediatric medulloblastoma. Neuro-oncol 2004;6: 200–7.
39. Park TJ, Han SU, Cho YK, Paik WK, Kim YB, Lim IK. Methylation of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene is associated significantly with K-ras mutation, lymph node invasion, tumor staging, and disease free survival in patients with gastric carcinoma. Cancer 2001;92:2760–8.
40. Pieper RO, Patel S, Ting SA, Futscher BW, Costello JF. Methylation of CpG island transcription factor binding sites is unnecessary for aberrant silencing of the human MGMT gene. J Biol Chem 1996;271: 13916–24.
41. Smith-Sorensen B, Lind GE, Skotheim RI, et al. Frequent promoter hypermethylation of the O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. Oncogene 2002;21:8878–84.
42. Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN methylation and expression in glioblastomas. Acta Neuropathol (Berl) 2003;106:479–85.
43. Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. p15 (INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. Blood 1999;94: 2445–51.
44. Lenz G, Hutter G, Hiddemann W, Dreyling M. Promoter methylation and expression of DNA repair genes hMLH1 and MGMT in acute myeloid leukemia. Ann Hematol 2004;83:628–33.
45. Bearzatto A, Szadkowski M, Macpherson P, Jiricny J, Karran P. Epigenetic regulation of the MGMT and hMSH6 DNA repair genes in cells resistant to methylating agents. Cancer Res 2000;60: 3262–70.
46. Bhakat KK, Mitra S. CpG methylation-dependent repression of the human O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration. Carcinogenesis 2003;24:1337–45.
47. Costello JF, Futscher BW, Tano K, Graunke DM, Pieper RO. Graded methylation in the promoter and body of the O^6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. J Biol Chem 1994;269: 17228–37.
48. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. Nat Rev Cancer 2004;4: 296–307.
49. Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O^6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. Oncogene 2004;23:1–8.
50. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med 2003;349:2042–54.
51. Kohya N, Miyazaki K, Matsukura S, et al. Deficient expression of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase combined with mismatch-repair proteins hMLH1 and hMSH2 is related to poor prognosis in human biliary tract carcinoma. Ann Surg Oncol 2002;9:371–9.

Implicación del patrón radiológico en el pronóstico de los tumores oligodendrogliales: correlación con el perfil genético

Marta Brell, Sara Castañer, Teresa Pujol-Farré, Susana Boluda, Teresa Ribalta, Jordi Bruna, María Martínez, Eugenia Verger, Salvador Villà, Nuria Viñolas, Miguel Gil, Francesc Graus, Avelina Tortosa-Moreno

Introducción. La codeleción *1p19q* (LOH*1p19q*) confiere a los tumores oligodendrogliales quimiosensibilidad y un mejor pronóstico en relación con otros gliomas. La investigación dirigida a identificar características radiológicas asociadas a LOH*1p19q* ha despertado gran interés en los últimos años.

Objetivos. Confirmar la existencia de heterogeneidad regional de los parámetros moleculares en los gliomas oligodendrogliales, valorar la asociación entre el perfil genético y determinadas características radiológicas y clínicas, y analizar el valor pronóstico de éstas.

Pacientes y métodos. Se incluyeron 54 pacientes tratados según un protocolo preestablecido común. Se valoraron las secuencias T_1, con/sin gadolinio, y T_2 de la resonancia magnética preoperatoria a ciegas de la información molecular y clínica. El análisis de LOH se efectuó sobre muestras pareadas de ADN tumoral y genómico.

Resultados. La presencia de LOH*1p* se halló fuertemente asociada a LOH19q ($p < 0,0001$). LOH*1p19q* resultó más frecuente en los tumores situados en el lóbulo frontal (*odds ratio*, OR = 5,38; intervalo de confianza del 95%, IC 95% = 1,51-19,13; $p = 0,007$) y sin necrosis radiológica (OR = 0,17; IC 95% = 0,03-0,80; $p = 0,02$). La localización frontal (riesgo relativo, RR = 4,499; IC 95% = 1,027-193,708; $p = 0,046$), la necrosis radiológica (RR = 0,213; IC 95% = 0,065-0,700; $p = 0,011$) y el grado de resección (RR = 9,231; IC 95% = 1,737-49,050; $p = 0,009$) resultaron factores pronósticos independientes de supervivencia global.

Conclusiones. En los tumores oligodendrogliales, además del análisis histológico y el estudio genético-molecular, la valoración de determinadas características radiológicas puede resultar de gran utilidad para definir subgrupos de pacientes con pronóstico y respuesta al tratamiento similares. Los esfuerzos deben dirigirse, por tanto, hacia la utilización combinada de todos los recursos disponibles en cada centro.

Palabras clave. LOH. Oligoastrocitoma. Oligodendroglioma. Pronóstico. Resonancia magnética. Supervivencia.

Servicio de Radiología (S. Castañer); Servicio de Anatomía Patológica (S. Boluda); Servicio de Neurología (J. Bruna); Hospital Universitari de Bellvitge. Servicio de Oncología Médica; Institut Català d´Oncologia; IDIBELL (M. Gil). Departamento de Enfermería Fundamental; IDIBELL; Universitat de Barcelona (A. Tortosa-Moreno); L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona. Servicio de Radiología (T. Pujol-Farré); Servicio de Anatomía Patológica (T. Ribalta); Servicio de Oncología Radioterápica (E. Verger); Servicio de Oncología Médica (N. Viñolas); Servicio de Neurología (F. Graus); Hospital Clínic; Barcelona. Servicio de Oncología Médica; Hospital del Mar (M. Martínez); Barcelona. Servicio de Oncología Radioterápica; Institut Català d'Oncologia; Hospital Germans Trias i Pujol (S. Villà); Badalona, Barcelona. Servicio de Neurocirugía; Hospital Universitario Son Dureta (M. Brell); Palma de Mallorca, España.

Correspondencia:
Dra. Avelina Tortosa Moreno. Departamento de Enfermería Fundamental. IDIBELL. Campus de Bellvitge. Universitat de Barcelona. Feixa Llarga, s/n. Pavelló Central, 3.ª planta. E-08907 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona).

Fax:
+34 934 024 216

E-mail:
atortosa@ub.edu

Financiación:
Financiado parcialmente por la beca FIS 08-1085 del Ministerio de Sanidad y Consumo y por la beca Fundación Mutua Madrileña 2007.

Agradecimientos:
Al Dr. A. Castells, por su soporte estadístico.

Aceptado tras revisión externa:
05.10.10.

Cómo citar este artículo:
Brell M, Castañer S, Pujol-Farré T, Boluda S, Ribalta T, Bruna J, et al.

Introducción

Los tumores oligodendrogliales, tanto puros como mixtos, presentan mejor pronóstico que los astrocitarios [1]. Un alto porcentaje de los tumores oligodendrogliales muestra pérdida de heterocigosidad de *1p19q* (LOH*1p19q*). La presencia de ésta, y particularmente de LOH*1p*, les confiere mayor quimiosensibilidad y mejor pronóstico en relación con otros gliomas [2]; sin embargo, la clasificación histopatológica actual sigue basándose en criterios morfológicos, por lo que resulta compleja en ocasiones, además de insuficiente para predecir la respuesta al tratamiento o el pronóstico de los pacientes [3]. La investigación dirigida a la identificación de características radiológicas asociadas a LOH*1p19q* y que, por tanto, permitan predecir el comportamiento biológico del tumor, ha despertado un gran interés en los últimos años [4,5-10]. El fundamento científico sobre el que se sustenta esta relación genético-radiológica es el hecho de que la codeleción *1p19q* –evento precoz en la génesis de los gliomas oligodendrogliales– podría traducir una menor capacidad invasiva e infiltrativa de aquellos tumores que la poseen, y condicionar así su aspecto radiológico, localización y extensión en el cerebro [11]. No obstante, la información publicada hasta la fecha es limitada y controvertida porque la mayoría de estudios son retrospectivos, usan clasificaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) previas a la vigente o incluyen esquemas terapéuticos heterogéneos, por lo que el análisis de factores pronósticos resulta poco fidedigno.

Sobre la hipótesis de que determinadas características radiológicas en pacientes con tumores oli-

Implicación del patrón radiológico en el pronóstico de los tumores oligodendrogliales: correlación con el perfil genético. Rev Neurol 201X; XX: XXX-XXX.

© 2010 Revista de Neurología

Tabla I. Características radiológicas, clínicas y moleculares de los pacientes incluidos.

Características radiológicas	
Aspecto invasivo en T_1	25 (46,3%)
Señal homogénea en T_2	14 (25,9%)
Captación de contraste	37 (68,5%)
Necrosis radiológica	13 (24,5%)
Localización frontal	34 (63,0%)
Localización temporal	14 (25,9%)
Características moleculares	
LOH*1p*	
Sí	33 (62,3%)
No	16 (30,2%)
No informativo	4 (7,5%)
LOH*19q*	
Sí	35 (66,0%)
No	13 (24,5%)
No informativo	5 (9,4%)
LOH*1p19q*	
Sí	31 (57,4%)
No	19 (35,2%)
No informativo	4 (7,4%)
Alelos intactos	
Sí	12 (22,6%)
No	41 (77,4%)
Características clínicas	
Epilepsia	31 (57,4%)
Focalidad	21 (38,9%)
Deterioro cognitivo	11 (20,4%)
Cefalea	13 (24,1%)
Hipertensión intracraneal	8 (14,8%)

godendrogliales puede definir subgrupos con pronóstico similar, los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes: confirmar la existencia de heterogeneidad regional de los parámetros moleculares en una serie de pacientes con diagnóstico consensuado de tumor oligodendroglial –tratados de acuerdo a un protocolo diagnóstico y terapéutico común–, valorar la asociación entre el perfil genético y determinadas características radiológicas y clínicas y analizar el valor pronóstico en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión de las variables radiológicas, clínicas y moleculares estudiadas.

Pacientes y métodos

Se incluyeron 54 pacientes con oligodendroglioma u oligoastrocitoma de grado II y III de la OMS. Todos los tumores fueron revisados y clasificados por dos neuropatólogos independientes, siguiendo la última actualización de la OMS [2]. Las muestras se recogieron durante la cirugía, se dejaron parafinadas para el estudio histológico y, en los casos con excedente, congeladas y almacenadas a –80 °C. Se consideraron tumores mixtos aquéllos con componente astrocitario y oligodendroglial en áreas geográficamente distintas y con un mínimo de componente oligodendroglial del 25%. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Asistencial y todos los pacientes dieron su consentimiento informado para participar.

Se aplicó un protocolo preestablecido común de diagnóstico y tratamiento que incluía cirugía, seguida de radio y quimioterapia para los gliomas de grado III, y de radioterapia para los de grado II resecados parcialmente o en recidiva/progresión. Los pacientes con deterioro del estado general o situación funcional precaria no recibieron tratamiento complementario. La radioterapia consistió en irradiación focal sobre el lecho tumoral más 2-3 cm de margen, con una dosis total de 50-54 Gy en los de grado II y de 60 Gy en los de grado III, en fracciones de 2 Gy/día. La quimioterapia consistió en carmustina (200 mg/m^2 cada 8 semanas × 6 ciclos), o PCV (procarbacina, 60mg/m^2 los días 8-21; lomustina, 110 mg/m^2 el día 1, y vincristina, 1,4 mg/m^2 los días 8 y 29 cada 6 semanas × 6 ciclos). Quedaron excluidos de la quimioterapia aquellos pacientes que presentaron progresión durante la radioterapia. La respuesta al tratamiento se evaluó mediante resonancia magnética (RM) según los criterios de Macdonald et al [12].

El análisis radiológico fue realizado por dos neurorradiólogos independientes a ciegas de la información molecular y clínica, y de acuerdo a la metodología publicada previamente [7,9]. Se valoraron en las secuencias T_1, con/sin gadolinio, y T_2 de la RM preoperatoria el aspecto invasivo en T_1 (límites mal definidos frente a límites bien definidos), la señal homogénea frente a heterogénea en T_2, la presencia frente a la ausencia de captación de contraste, la presencia frente a la ausencia de necrosis ra-

diológica y la localización. Se consideró como localización aquel lóbulo en el que residía la mayor parte de la masa tumoral.

El ADN tumoral se obtuvo de las muestras parafinadas o congeladas de acuerdo con protocolos previos [13], y el ADN genómico de linfocitos de sangre periférica se consiguió con el *kit* comercial QIAamp ® 96 DNA Blood Kit (Qiagen, Alemania). Se estudió la LOH en muestras pareadas de ADN tumoral y genómico utilizando marcadores de microsatélite en 1p36 (D1S2734, D1S199, D1S508) y 19q13 (D19S219, D19S112, D19S412, D19S596). Las condiciones de amplificación y la secuencia de los cebadores se obtuvieron de la base de datos Genome Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome). Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa se examinaron con el analizador Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer, y el patrón de los alelos, con el *software* GeneMapper 3.0 (Applied Biosystems). Las variables clínicas recogidas fueron sintomatología de presentación (epilepsia, focalidad, deterioro cognitivo, cefalea e hipertensión intracraneal) y el tipo de cirugía (biopsia, resección parcial o completa) [14].

El análisis estadístico de la asociación entre las características radiológicas/clínicas y moleculares se efectuó mediante la prueba de chi al cuadrado y el test exacto de Fisher. La localización se dicotomizó en frontal frente a no frontal de acuerdo con estudios previos [5,9]. La supervivencia global se calculó desde la fecha de la intervención quirúrgica hasta el momento del fallecimiento, y la supervivencia libre de progresión, desde la cirugía hasta la recidiva/progresión. Las curvas de supervivencia se elaboraron según el método de Kaplan-Meier y se compararon mediante el test de *log-rank*. El análisis de factores pronósticos se realizó sobre el subgrupo de pacientes con gliomas anaplásicos. Las variables con nivel de significación $p \leq 0{,}1$ en el análisis univariante se incluyeron en el multivariante según el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

Se empleó el programa estadístico SPSS v. 16.0 y un nivel de significación de $p = 0{,}05$.

Resultados

De los 54 pacientes incluidos en el estudio, 16 (29,6%) fueron de grado II (10 con oligodendroglioma y 6 con oligoastrocitoma) y 38 (70,4%) de grado III (18 con oligodendroglioma y 20 con oligoastrocitoma). Veintiséis (48,1%) eran hombres; la mediana de edad fue de 47 años (rango: 21-78 años). Se dispuso de seguimiento clínico en todos los casos con una mediana de 76,1 meses (rango: 20,17-168,5 meses). Las características clínicas, radiológicas y moleculares se muestran en la tabla I. En 16 (29,6%) pacientes se realizó una resección completa, mientras que en 38 (70,4%) sólo parcial ($n = 31$) o biopsia ($n = 7$). La localización del tumor no condicionó el grado de resección ($p = 0{,}56$). Tres pacientes (7,8%) con gliomas anaplásicos no recibieron radioterapia –dos por haberla recibido previamente y uno por mal estado general– y seis (15,7%) no recibieron quimioterapia por antecedentes patológicos que lo contraindicaban en un caso y por situación funcional precaria en el resto. De los pacientes con tumores de grado II, siete (43,7%) recibieron radioterapia, cuatro tras resecciones incompletas y tres por existir recidiva/progresión de gliomas previos. Un paciente con oligoastrocitoma de grado II recibió quimioterapia durante la progresión.

Se dispuso de material para el análisis molecular en 53 casos (98,1%). Se halló una fuerte asociación entre LOH*1p* y LOH*19q*, de modo que 31 (96,8%) de los 32 tumores con LOH*1p* presentaban también LOH*19q*, y a la inversa, 31 (88,5%) de los 35 tumores con LOH*19q* mostraron LOH*1p* concomitante ($p < 0{,}0001$). En el subanálisis por tipo histológico, se halló LOH*1p* en el 76% de los oligodendrogliomas y en el 58,3% de los tumores mixtos ($p = 0{,}18$); LOH*19q* en el 79,1% de los oligodendrogliomas y en el 66,6% de los oligoastrocitomas ($p = 0{,}33$) y LOH*1p19q* en el 68% de los tumores puros y en el 58,3% de los mixtos ($p = 0{,}48$). En relación con el grado, se detectó LOH*1p* en el 73,3% de los tumores de grado II y en el 64,7% de los de grado III ($p = 0{,}74$), LOH*19q* en el 68,7% de los tumores de bajo grado y en el 75% de los anaplásicos ($p = 0{,}73$) y LOH*1p19q* en el 62,5% de los tumores de bajo grado frente al 63,6% de los anaplásicos ($p = 0{,}93$).

El análisis de correlación con las características radiológicas demostró una asociación estadísticamente significativa entre localización frontal y LOH*1p* (*odds ratio*, OR = 6,19; intervalo de confianza del 95%, IC 95% = 1,66-22,68; $p = 0{,}004$), LOH*19q* (OR = 7,59; IC 95% = 1,84-31,34; $p = 0{,}006$) y LOH*1p19q* (OR = 5,38; IC 95% = 1,51-19,13; $p = 0{,}007$), así como entre ausencia de necrosis radiológica y codeleción *1p19q* (OR = 0,17; IC 95% = 0,03-0,80, $p = 0{,}02$). Esta asociación se mantuvo en el subanálisis realizado sobre los tumores mixtos –localización frontal y LOH*1p* ($p = 0{,}006$), localización frontal y LOH*19q* ($p = 0{,}001$), localización frontal y LOH*1p19q* ($p = 0{,}006$)– y anaplásicos –localización frontal y LOH*1p* ($p = 0{,}02$), localización frontal y LOH*19q* (p = 0,002), localización frontal y LOH*1p19q* ($p = 0{,}02$)–, en los que también se observó asocia-

Figura 1. Curva de supervivencia según el método de Kaplan-Meier para localización.

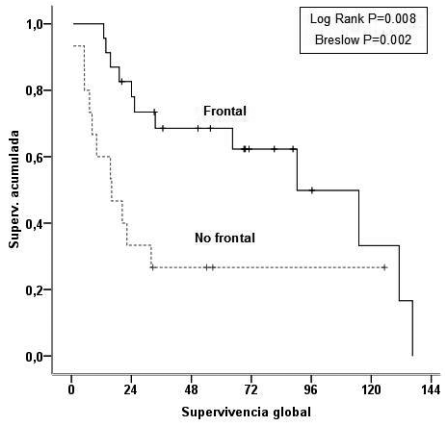


Figura 2. Curva de supervivencia según el método de Kaplan-Meier para necrosis radiológica.

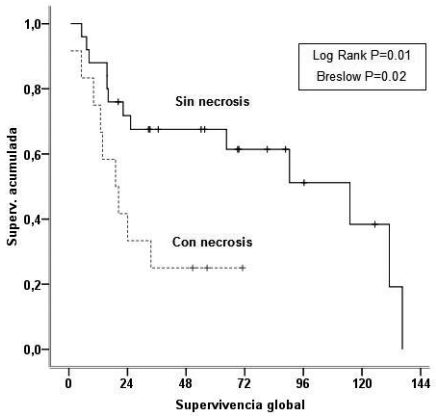


Figura 3. Supervivencia global según el método de Kaplan-Meier para LOH*1p19q*.

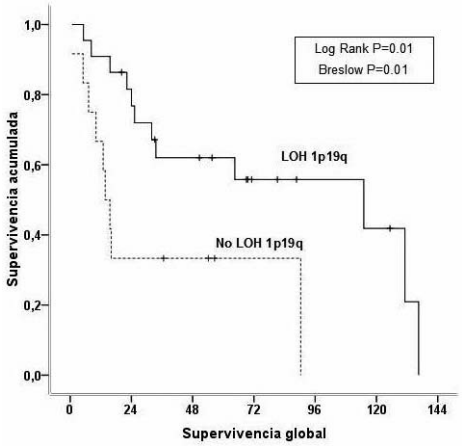
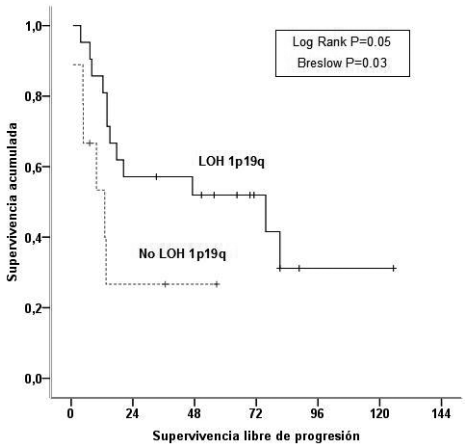


Figura 4. Supervivencia libre de progresión según el método de Kaplan-Meier para LOH*1p19q*.



ción significativa entre ausencia de necrosis radiológica y LOH*1p19q* (p = 0,04). El resto de los aspectos radiológicos analizados no demostró asociación significativa con las características moleculares. De las variables clínicas, sólo la focalidad resultó significativamente menor en los pacientes cuyos tumores presentaban LOH*1p* (p = 0,048).

La mediana de supervivencia global resultó significativamente menor en los pacientes con glioma anaplásico, 64,5 meses (rango: 3,47-125,5 meses), no alcanzada en los pacientes con glioma de grado II (p = 0,002). La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 20,3 meses (rango: 0-54,9 meses) para los tumores anaplásicos y de 54,7 meses (rango: 38,2-71,3 meses) para los de bajo grado. En el análisis univariante la necrosis radiológica y la localización mostraron un impacto significativo en la supervivencia global (Figs. 1 y 2). El grado de resección sólo mostró una tendencia hacia la significación estadística (p = 0,104), mientras que la histología pura frente a mixta no resultó un factor pronóstico. Por lo que respecta a las características molecula-

Tabla II. Análisis multivariante de factores pronósticos en los gliomas anaplásicos (*n* = 38).

	Supervivencia global		Supervivencia libre de progresión	
	RR (IC 95%)	*p*	RR (IC 95%)	*p*
Localización frontal	4,499 (1,027-19,708)	0,046 [a]	1,174 (0,469-2,939)	0,732
Presencia de necrosis	0,213 (0,065-0,700)	0,011 [a]	0,868 (0,476-1,585)	0,645
Resección completa	9,231 (1,737-49,050)	0,009 [a]	13,572 (1,461-126,069)	0,022 [a]
Presencia de LOH*1p19q*	1,755 (0,405-7,605)	0,452	1,174 (0,469-2,939)	0,732

[a] **:????**. RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

res, LOH*1p*, LOH*19q* y LOH*1p19q* resultaron factores pronósticos de supervivencia global y libre de progresión (Figs. 3 y 4). En el análisis multivariante la localización frontal, la necrosis radiológica y el grado de resección permanecieron como factores pronósticos independientes de supervivencia global, mientras que sólo el grado de resección resultó un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión (Tabla II).

En el subanálisis realizado sobre los pacientes con oligoastrocitomas, la localización (*hazard ratio*, HR = 3,834; IC 95% = 1,053-13,949; *p* = 0,041) y la necrosis radiológica (HR = 0,125; IC 95% = 0,034-0,457; *p* = 0,001) también mostraron impacto pronóstico en el análisis univariante, junto con las características moleculares: LOH*1p* (HR = 5,224; IC 95% = 1,314-20,765; *p* = 0,018), LOH*19q* (HR = 5,329; IC 95% = 1,379-20,592; *p* = 0,015), LOH*1p19q* (HR = 5,224; IC 95% = 1,314-20,765; *p* = 0,018). La necrosis radiológica fue la única variable con influencia pronóstica en el análisis multivariado (HR = 0,046; IC 95% = 0,006-0,332; *p* = 0,002).

Discusión

Los resultados del presente estudio demuestran que los oligodendrogliomas puros o mixtos situados en el lóbulo frontal presentan con mayor frecuencia LOH*1p19q*, mientras que aquéllos con alelos intactos asientan fundamentalmente en el lóbulo temporal, y corroboran, por lo tanto, la existencia de heterogeneidad molecular dependiente de la región en los tumores oligodendrogliales [5,6,8,9,15,16]. El fundamento biológico de esta asociación genético-radiológica continúa siendo desconocido en la actualidad, y se especula con dos hipótesis. En primer lugar, se ha relacionado con aspectos del medio extracelular [17], de forma que factores de crecimiento secretados por áreas concretas del cerebro facilitarían el desarrollo específico de determinadas células neoplásicas; por ejemplo, aquéllas con LOH*1p19q* [1,9]. La segunda posibilidad es que la diferenciación de la extirpe oligodendroglial se produzca de manera muy precoz durante el desarrollo embrionario, de manera que se originen distintas subpoblaciones de oligodendrocitos que adoptarán diferentes vías de migración colonizando de manera dirigida áreas cerebrales específicas [18-20].

Asimismo, en nuestro estudio la localización frontal y la ausencia de necrosis radiológica se asociaron de forma independiente a una mayor supervivencia. Algunos trabajos previos describen menor quimiosensibilidad de los oligodendrogliomas anaplásicos localizados en el lóbulo temporal/ínsula/diencéfalo, sin que ello se traduzca en diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes [9]. Existe la posibilidad de que el impacto pronóstico de las variables radiológicas se deba en realidad a su asociación con las alteraciones moleculares [21], y sea simplemente una expresión subrogada de éstas. De hecho, en nuestra serie la localización frontal y la necrosis radiológica se asociaron de manera significativa a LOH*1p19q*. Por ello, tanto los factores moleculares como los radiológicos se incluyeron en el análisis multivariante, y permanecieron la localización y la necrosis como factores pronósticos independientes. El número limitado de pacientes obliga, no obstante, a considerar estos resultados con precaución y justifica probablemente que las alteraciones cromosómicas no hayan permanecido como factores independientes en el análisis multivariado [22]. De todas formas, existe también la posibilidad de que durante el desarrollo los

tumores experimenten modificaciones epigenéticas con impacto en su evolución [23].

En lo referente al grado de resección, los resultados de nuestra serie confirman que la resección completa es factor pronóstico independiente de supervivencia global y libre de progresión, tal como se había postulado anteriormente [24,25]. Aunque la topografía tumoral puede condicionar las opciones quirúrgicas, y por lo tanto de manera indirecta el pronóstico, no hallamos en nuestra serie una asociación significativa entre la localización y el grado de resección.

Respecto a la histología, no encontramos diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes con oligodendrogliomas anaplásicos en relación con aquéllos con oligoastrocitomas anaplásicos, ni tampoco en el perfil molecular en función de la histología pura o mixta, con lo que se corroboran los resultados de series previas [24-27]. Aunque existe cierta controversia, parece ser el genotipo subyacente lo que verdaderamente condiciona el pronóstico de los pacientes con gliomas mixtos y no el subtipo histológico [15,28].

En conclusión, el objetivo de clasificar los gliomas es definir subgrupos de pacientes con un pronóstico y respuesta al tratamiento similares. Para ello, además del análisis histológico, el estudio genético proporciona información muy valiosa. Nuestros resultados confirman que las deleciones de *1p*, *19q* y *1p19q* son más frecuentes en los tumores oligodendrogliales que asientan en el lóbulo frontal y carecen de necrosis radiológica. Además, estas características radiológicas poseen *per se* influencia pronóstica; sin embargo, la asociación genético-radiológica adolece de algunas excepciones, por lo que resulta improbable que pueda llegar a predecirse el estado de *1p19q* tomando como base exclusivamente aspectos radiológicos [11]. Los esfuerzos deben dirigirse, por tanto, hacia la utilización combinada de todos los recursos disponibles en cada centro (radiología, inmunohistoquímica, aspectos clínicos y estudio genético) [6,29,30]. Se requieren series mayores para validar estos resultados preliminares.

Bibliografía

1. Huang L, Jiang T, Yuan F, Li GL, Cui Y, Liu EZ, et al. Correlation of chromosomes 1p and 19q status and expressions of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), p53 and Ki-67 in diffuse gliomas of World Health Organization (WHO) grades II and III: a clinicopathological study. Neuropathol Appl Neurobiol 2009; 35: 367-79.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the central nervous system. 4 ed. Lyon: IARC; 2007.
3. Blesa D, Mollejo M, Ruano Y, De Lope AR, Fiano C, Ribalta T, et al. Novel genomic alterations and mechanisms associated with tumor progression in oligodendroglioma and mixed oligoastrocytoma. J Neuropathol Exp Neurol 2009; 68: 274-85.
4. Walker C, Du Plessis DG, Joyce KA, Fildes D, Gee A, Haylock B, et al. Molecular pathology and clinical characteristics of oligodendroglial neoplasms. Ann Neurol 2005; 57: 855-65.
5. Laigle-Donadey F, Martin-Duverneuil N, Lejeune J, Crinière E, Capelle L, Duffau H, et al. Correlations between molecular profile and radiologic pattern in oligodendroglial tumors. Neurology 2004; 63: 2360-2.
6. McDonald JM, See SJ, Tremont IW, Colman H, Gilbert MR, Groves M, et al. The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors. Cancer 2005; 104: 1468-77.
7. Megyesi JF, Kachur E, Lee DH, Zlatescu MC, Betensky RA, Forsyth PA, et al. Imaging correlates of molecular signatures in oligodendrogliomas. Clin Cancer Res 2004; 10: 4303-6.
8. Mueller W, Hartmann C, Hoffmann A, Lanksch W, Kiwith J, Tonn J, et al. Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. Am J Pathol 2002; 161: 313-9.
9. Zlatescu MC, Tehrani Yazdi A, Sasaki H, Megyesi JF, Betensky RA, Louis DN, et al. Tumor location and growth patter correlate with genetic signature in oligodendroglial neoplasms. Cancer Res 2001; 61: 6713-5.
10. Whitmore RG, Krejza J, Kapoor GS, Huse J, Woo JH, Bloom S, et al. Prediction of oligodendroglial tumor subtype and grade using perfusion weighted magnetic resonance imaging. J Neurosurg 2007; 107: 600-9.
11. Jenkinson MD, Du Plessis DG, Smith TS, Joyce KA, Warnke PC, Walker C. Histological growth patterns and genotype in oligodendroglial tumours: correlation with MRI features. Brain 2006; 129: 1884-91.
12. Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC Jr, Cairncross JG. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. J Clin Oncol 1990; 8: 1277-80.
13. Brell M, Tortosa A, Verger E, Gil JM, Viñolas N, Villà S, et al. Prognostic significance of O_6-methilguanine. DNA methyltransferase determined by promoter methylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. Clin Cancer Res 2005; 11: 5167-71.
14. Van den Bent MJ, Looijenga LHJ, Langenberg K, Dinjens W, Graveland W, Uytdewilligen L, et al. Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. Cancer 2003; 97: 1276-84.
15. Huang L, Jiang T, Yuan F, Li GL, Liu EZ, Wang ZC. Correlations between molecular profile and tumor location in chinese patients with oligodendroglial tumors. Clin Neurol Neurosurg 2008; 110: 1020-4.
16. Kouwenhoven MC, Gorlia T, Kros JM, Ibdaih A, Brandes AA, Bromberg JE, et al. Molecular analysis of anaplastic oligodendroglial tumors in a prospective randomized study: a report from EORTC study 26951. Neuro Oncol 2009; 11: 737-46.
17. Mukasa A, Ueki K, Matsumoto S, Tsutsumi S, Nishikawa R, Fujimaki T, et al. Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. Oncogene 2002; 21: 3961-8.
18. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. J Natl Cancer Inst 1998; 90: 1473-9.
19. Cairncross JG. Imaging molecular signatures in oligodendroglioma. Cancer Res 2004; 10: 7109-11.
20. López JI, Pomposo-Gaztelu I. Patología quirúrgica de la epilepsia. Rev Neurol 2010; 50: 616-22.
21. Kim SH, Kim H, Kim TS. Clinical, histological, and immunohistochemical features predicting 1p/19q loss of heterozygosity in oligodendroglial tumors. Acta Neuropathol 2005; 110: 27-38.
22. Weller M, Berger H, Hartmann C, Schramm J, Westphal M, Simon M, et al. Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker? Clin Cancer Res 2007; 13 : 6933-7.

23. Campbell BA, Horsman DE, Maguire J, Young S, Curman D, Ma R, et al. Chromosomal alterations in oligodendroglial tumours over multiple surgeries: is tumour progression associated with change in 1p/19q status? J Neurooncol 2008; 89: 37-45.
24. Park CK, Lee SH, Han JH, Kim CY, Kim DW, Paek SH, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in WHO grade III glioma patients treated with radiotherapy or radiotherapy plus chemotherapy. BMC Cancer 2009; 9: 450.
25. Sanai N, Berger MS. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. Neurosurgery 2008; 62: 753-64.
26. Kanamori M, Kumabe T, Sonoda Y, Nishino Y, Watanabe M, Tominaga T. Predictive factors for overall and progression-free survival, and dissemination in oligodendroglial tumors. J Neurooncol 2009; 93: 219-28.
27. DeAngelis LM. Anaplastic glioma: how to prognosticate outcome and choose a treatment strategy. J Clin Oncol 2009; 27: 5861-2.
28. Van den Bent MJ, Reni M, Gatta G, Vecht C. Oligodendroglioma. Crit Rev Oncol Hematol 2008; 66: 262-72.
29. Kapoor GS, Gocke TA, Chawla S, Whitmore RG, Nabavizadeh A, Krejza J, et al. Magnetic resonance perfusion-weighted imaging defines angiogenic subtypes of oligodendroglioma according to 1p19q and EGFR status. J Neurooncol 2009; 92: 373-86.
30. Kim JW, Park CK, Park SH, Kim YH, Han JH, Kim CY, et al. Relationship between radiological characteristics and combined 1p and 19q deletion in World Health Organization grade III oligodendroglial tumours. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2010; Jun 28. [Epub ahead of print].

Implication of radiological pattern in the prognosis of oligodendroglial tumors: correlation with genetic profile

Introduction. *1p19q* loss of heterozygosity (LOH*1p19q*) in oligodendroglial tumors has shown to be prognostic of prolonged survival and predictive of therapeutic responsiveness. During the last years, research is actively being directed to the discovery of radiological characteristics related to LOH*1p19q.*

Aims. To confirm the existence of molecular heterogeneity in oligodendroglial tumors in relation to their anatomic distribution, and to evaluate the correlation between molecular profile and other radiological and clinical characteristics and their prognostic impact.

Patients and methods. Fifty-four patients with oligodendroglial tumors managed according to a previously established protocol were included. Preoperative SE T_1, T_1 post-gadolinium and T_2 magnetic resonance images were reviewed by two independent neuroradiologists, blinded to clinical and molecular information. LOH analysis was assessed from paired tumor-blood DNA acid samples.

Results. LOH*1p* was highly associated with LOH*19q* ($p < 0.0001$), LOH*1p* (odds ratio, OR = 6.19; 95% confidence interval, 95% CI = 1.66-22.68; $p = 0.004$), LOH*19q* (OR = 7.59; 95% CI = 1.84-31.34; $p = 0.006$) and LOH*1p19q* (OR = 5.38; 95% CI = 1.51-19.13; $p = 0.007$) were found to be more frequent in tumors located in the frontal lobe. Frontal location (hazard ratio, HR = 4.499; 95% CI = 1.027-193.708; $p = 0.046$), ring enhancement (HR = 0.213; 95% CI = 0.065-0.700; $p = 0.011$) and extent of resection (HR = 9.231; 95% CI = 1.737-49.050; $p = 0.009$) resulted independent prognostic factors for overall survival in the multivariate analysis.

Conclusions. Glioma classification aims to better define patients prognosis. Besides histological and immunohistochemical analyses, molecular information has become of great importance. Our results indicate that the evaluation of some MR features may also be useful. Efforts must be directed toward the use of every available resource at each institution.

Key words.

Brell et al. BMC Cancer 2011, 11:35
http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/35

BMC Cancer

RESEARCH ARTICLE Open Access

O6-Methylguanine-DNA methyltransferase protein expression by immunohistochemistry in brain and non-brain systemic tumours: systematic review and meta-analysis of correlation with methylation-specific polymerase chain reaction

Marta Brell[1*], Javier Ibáñez[1], Avelina Tortosa[2]

Abstract

Background: The DNA repair protein O^6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) confers resistance to alkylating agents. Several methods have been applied to its analysis, with methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) the most commonly used for promoter methylation study, while immunohistochemistry (IHC) has become the most frequently used for the detection of MGMT protein expression. Agreement on the best and most reliable technique for evaluating MGMT status remains unsettled. The aim of this study was to perform a systematic review and meta-analysis of the correlation between IHC and MSP.

Methods: A computer-aided search of MEDLINE (1950-October 2009), EBSCO (1966-October 2009) and EMBASE (1974-October 2009) was performed for relevant publications. Studies meeting inclusion criteria were those comparing MGMT protein expression by IHC with *MGMT* promoter methylation by MSP in the same cohort of patients. Methodological quality was assessed by using the QUADAS and STARD instruments. Previously published guidelines were followed for meta-analysis performance.

Results: Of 254 studies identified as eligible for full-text review, 52 (20.5%) met the inclusion criteria. The review showed that results of MGMT protein expression by IHC are not in close agreement with those obtained with MSP. Moreover, type of tumour (primary brain tumour *vs* others) was an independent covariate of accuracy estimates in the meta-regression analysis beyond the *cut-off* value.

Conclusions: Protein expression assessed by IHC alone fails to reflect the promoter methylation status of *MGMT*. Thus, in attempts at clinical diagnosis the two methods seem to select different groups of patients and should not be used interchangeably.

Background

The cellular protein O^6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) is a DNA-repair protein that removes mutagenic and cytotoxic adducts from O^6-guanine in DNA. Alkylating agents are among the most widely used chemotherapeutic drugs in human cancer. Alkylation induced by these compounds can produce either lethal double-strand cross-links, as is the case with bifunctional nitrosoureas (BCNU), or induce mismatch abortive repair and DNA fragmentation, as is the case with temozolomide [1-4]. The toxicity of alkylating agents is reduced in the presence of MGMT. Thus, MGMT confers resistance to alkylating agents in a wide spectrum of human tumours by reversing DNA toxicity. In brain neoplasms, hypermethylation of CpG islands in the *MGMT* gene promoter region, rather than mutation or deletion, is the major mechanism for the loss of MGMT function [2,5-7]. As a consequence, tumours

* Correspondence: m.brell@telefonica.net
[1]Department of Neurosurgery, Son Dureta University Hospital, Palma de Mallorca, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central
© 2011 Brell et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

with epigenetic silencing of *MGMT* gene become more sensitive to the killing effects of alkylating agents. Moreover, several studies have demonstrated that epigenetic silencing of MGMT is a relevant prognostic factor in patients with glioblastoma, anaplastic glioma and low grade glioma [8-14]. In fact, MGMT status has recently been recommended as a stratifying factor for patients in glioma trials [15,16].

Many methods and protocols have been applied for MGMT analysis in gliomas, but to date there is no consensus on which strategy should be primarily employed [17]. Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) is the most commonly used test [9]. Indeed, in glioblastoma clinical trials, a strong correlation of the methylation status of *MGMT* with temozolomide response and patient outcome was shown. However, there are some methodological problems that limit the usefulness of this method in a routine diagnostic setting: it is complex, time-consuming, and highly dependent on tissue quality [18,19]. MGMT status can also be assessed by analyzing protein expression by immunohistochemistry (IHC). IHC is a reliable, commonly used method in diagnostic histopathology that is available in most laboratories. In addition, IHC is easier to use, less expensive and faster than MSP [20-29], and consequently it has become the most frequently used method for the detection of MGMT protein expression in the past decade [30]. In this line, some retrospective clinical reports have also shown a prognostic association between MGMT protein expression and/or activity and outcome.

However, studies aimed at evaluating the correlation between aberrant promoter methylation and loss of protein expression have yielded contradictory results, not only in brain tumours but also in other neoplasms. While we and other authors have shown that the relationship between *MGMT* promoter methylation status and MGMT protein expression is not absolute [31], other studies have found a strong correlation between homogeneous immunoreactivity and unmethylated promoter [32]. At present, there is a lack of data on which to base recommendations for a specific method or protocol for MGMT testing. Accordingly, there is a strong need for systematic comparisons and validation of intra- and interlaboratory reproducibility of different methods for MGMT assessment in order to identify the best method for clinical MGMT testing [33].

The aim of this study was to perform a systematic review and a meta-analysis of the correlation between MGMT IHC and MSP in a large array of human brain and non-brain systemic tumours. Our primary objective was to assess the diagnostic accuracy of IHC at different *cut-off* values for test positivity. Because test accuracy is not a fixed property of a test [34], we have also studied several possible sources of heterogeneity such as subgroups of patients, differing interpretations of results, and study design features.

Methods

This systematic review and meta-analysis was performed following previously published guidelines [34-37].

Literature Search

A computer-aided search of MEDLINE (1950-October 2009), EBSCO (1966-October 2009) and EMBASE (1974-October 2009) was performed for relevant publications. Medical Subject Heading (MeSH) terms with accompanying entry terms were used (Additional file 1). To identify additional published, unpublished and ongoing studies, we entered relevant studies identified from the above sources into PubMed and then used the Related Articles function. The Science Citation Index was searched to identify articles citing relevant publications. The reference lists of all selected papers were also reviewed for search completion. Only English-language literature was considered eligible. Titles and abstracts were screened by two reviewers (M.B. and J.I.) to identify relevant articles. Discrepancies were resolved by consensus.

Criteria for inclusion of studies

Studies meeting inclusion criteria were those comparing MGMT protein expression by IHC with *MGMT* promoter methylation by MSP as the reference test in the same cohort of patients. Not only brain tumour series but also others involving any type of cancer were considered eligible whenever both diagnostic tests were used in the same population. Studies on cellular lines were excluded. Information had to be available to allow the construction of the diagnostic two-by-two table with its four cells: true positive, false negative, false positive and true negative.

Index test and reference test

IHC performed with different commercially available antibodies was the test under evaluation and MSP was considered the reference test, as it is the most commonly used.

Quality assessment and data extraction

Methodological quality of included studies was assessed independently by two observers (M.B. and J.I.) using the QUADAS tool [38] which was specifically developed for systematic reviews of diagnostic test accuracy studies. The tool is based on 14 items scored as “yes”, “no”, or “unclear”. The items from the QUADAS tool and their interpretation can be found in Additional file 2.

Data extraction was performed independently by two authors (M.B. and J.I.), and included author and date,

journal of publication, time of data collection, testing procedure, study population, reference test, performance of the reference test and of the index test, *cut-off* value used for immunolabeling, QUADAS-items, whether histological analysis of the tissue used for DNA extraction was performed or not, the percentage of methylated cases by MSP, the effect of methylated promoter/protein expression on survival, and data for two-by-two table. A quality score was not used as a weighting variable because of its subjectivity [39]. The STARD [40] checklist and flow diagram were also followed as recommended.

Data analysis

Studies reporting insufficient data for the construction of a two-by-two table were excluded from final analyses. Data from the two-by-two tables were used to calculate sensitivity, specificity and diagnostic odds ratio for each study. We present individual study results graphically by plotting the estimates of sensitivity and specificity (and their 95%CI) in both forest plots and the receiver operating characteristic (ROC) space. Heterogeneity was investigated in the first instance through visual inspection of the relationship between pairs of accuracy estimates in forest plots and sROC space [41]. As one of the primary causes of heterogeneity in test accuracy studies is the threshold effect, which arises when different *cut-offs* are used in different studies to define a positive (or negative) test result, the computation of the Spearman correlation coefficient between the logit of sensitivity and logit of 1-specificity was also performed. A strong positive correlation suggests this threshold effect. In order to explore for heterogeneity other than threshold effect, the chi-square and Cochrane-Q tests were used. A low p-value suggests the presence of heterogeneity beyond what could be expected by chance alone. The inconsistency index (I-squared) was used to quantify the amount of consistency–that is, the percentage of total variation across studies due to heterogeneity rather than chance. Statistical heterogeneity can be defined as low, moderate and high for I^2 values of 25%, 50% and 75% [42]. When a substantial heterogeneity was found, the reasons for it were explored by relating study level covariates to diagnostic odds ratio, using meta-regression techniques. Subgroup analyses trying to identify homogeneity were then performed but in all cases pooling was done using methods based on a random effect model. This model assumes that in addition to the presence of random error, differences between studies can also result from real differences between study populations and procedures, and it includes both within-study and between-study variations. Sensitivity and specificity were compared between these subgroups using the z-test [36]. Publication bias was examined by construction of a funnel-plot. The x-axis consisted of the natural logarithm of the diagnostic odds radio, and the y-axis was the standard error, which is considered the best choice [43]. In the absence of bias the graph resembles a symmetrical inverted funnel because the accuracy estimates from smaller studies scatter more widely at the bottom of the graph, with the spread narrowing with increasing accuracy among larger studies. If there is publication bias the funnel plot will appear skewed and asymmetrical. Although useful, interpretation of the funnel-plot is subjective; for this reason the Egger's regression test became necessary in order to measure the funnel-plot asymmetry numerically [44]. The intercept provides a measure of the assymetry: the greater its deviation from zero the more pronounced the asymmetry.

Statistical analysis was performed using Meta-Disc software http://www.hrc.es/investigacion/metadisc_en.htm[45]. The analysis for publication bias was performed using CMA-1 http://www.Meta-Analysis.com. Two-sided $P < .05$ was considered to be statistically significant.

Results

Results of the search and study characteristics

The initial search strategy yielded 812 articles, 254 of which were eligible for full-text review. Of these, 182 studies were ruled out, and 72 were selected for data extraction. All selected studies were diagnostic cohort studies. Seventeen studies [20,26,30,46-59] reported data that were insufficient for the construction of the two-by-two table, and in 3 studies [60-62] protein expression was assessed by a test other than IHC. These 20 studies were not included in the analysis. Thus, 52 relevant studies constitute the basis of this analysis (17 glioma studies, 3 non-glioma brain tumour studies and 32 non-brain systemic tumour studies) comprising a total of 2,943 patients: 539 with primary brain tumours, 178 with brain metastases of various solid tumours and 2,226 with non-brain systemic cancer (Figure 1). Additional file 3 and Additional file 4 show the characteristics of included studies.

Regarding the IHC analysis, the most commonly used antibody was anti-MGMT mouse monoclonal clone MT3.1 (from Dako, Chemicon International, NeoMarkers, Santa Cruz Biotechnology or Kamiya Biomedical Laboratories), which was reported in 39 out of 52 (75%) studies, followed by anti-MGMT mouse monoclonal antibody clone MT23.2 (from Zymed Laboratory) which was used in 4 (7.6%) series. Other commercially available anti-MGMT antibodies were reported in 7 (13.4%) additional studies. In one study, no laboratory specification was reported [63]. MGMT immunoexpression was qualitatively analyzed in 16 out of 52 (30.8%) studies.

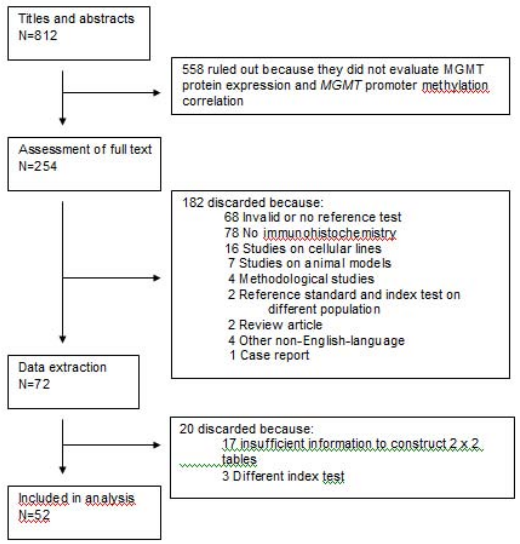


Figure 1 Flow diagram of inclusion process.

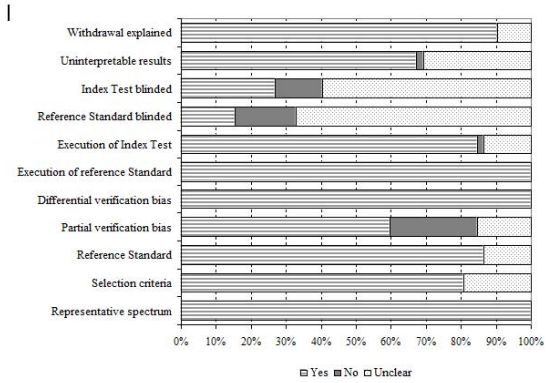


Figure 2 Methodological quality graph.

Accordingly, a semiquantitative score which estimates the fraction of positive cells was used in 36 studies (69.2%). Indeed, MGMT expression was evaluated by semiquantitative scoring in the majority of the brain tumour studies (18 out of 20) and in 18 out of 32 systemic tumour series. As shown in Additional file 3 and Additional file 4, different *cut-off* values were used, ranging from 5% to 80%. Statistically significant association between IHC and MSP was found in 9 out of 20 brain tumour studies, while in the group of non-brain systemic tumours this concordance between the two tests was observed in 29 of the 32 series (90.6%).

Regarding the MSP analysis, genomic DNA was isolated from formalin-fixed paraffin-embedded tissue in 26 studies (50%), whereas in 21 cases it was isolated from fresh-frozen samples (40.3%). In five studies (9.6%) DNA was isolated from both types of specimens. Sodium bisulfite modification of isolated DNA was performed using commercially available DNA methylation kits in nearly half of them (24 out of 52) including DNA Methylation Kit (Zymo Research), Methylamp DNA Modification Kit (Epigentek Inc), CpGenome DNA Modification Kit (Intergen), and Fast DNA Modification Kit (Chemicon).

Methodological quality of included studies

Figure 2 and Additional file 5 show assessment of methodological quality of included studies using the QUADAS tool. Inclusion of a representative patient spectrum and explanation of selection criteria or withdrawals did not constitute a limitation of any study. Eight studies reported the use of some modification of the original MSP as the reference test [32,64-70]. In approximately one quarter of the studies, partial verification bias was not clearly avoided as not all cases evaluated with the index test were verified using the reference test. Some authors reported that only tumour samples with an estimated tumour cell content of at least 80% were used for molecular studies [71], while in others this requirement was not clearly reported.

Immunohistochemical expression was scored semiquantitatively or qualitatively in all but six studies [1,64,69,72-74], in which interpretation of the index test was not satisfactorily explained by the authors. We did not expect any differential verification bias because all studies used the same reference test for the whole cohort of patients. In 84.6% of the studies, the authors did not unequivocally state whether assessment of the reference test was blinded for the IHC results, and in 73% of the series, no details were reported about blinding of the index test. Seventeen studies reported no details about any uninterpretable or indeterminate index test results [2,64,66,70,73-85].

Data analysis

Tabular results for sensitivity, specificity, likelihood ratios and diagnostic odds ratios for all studies are given in Additional file 6. At this early stage of the analysis, the pooled summary of accuracy measures was not taken into account, as significant heterogeneity was suggested when observing the forest plots and the sROC space (Figures 3A and 3B). No statistically significant difference was observed when exploring for threshold effect, either considering all studies (n = 52, Spearman correlation coefficient = -0.022; p = 0.881) or just the subgroup of studies in which semiquantitative scoring was used (n = 36, Spearman correlation coefficient = 0.037; p = 0.833). However, statistical heterogeneity was observed for sensitivity (chi-square = 234.28; df = 42 (p < 0.0001), inconsistency (I^2) = 79.5%), specificity (chi-

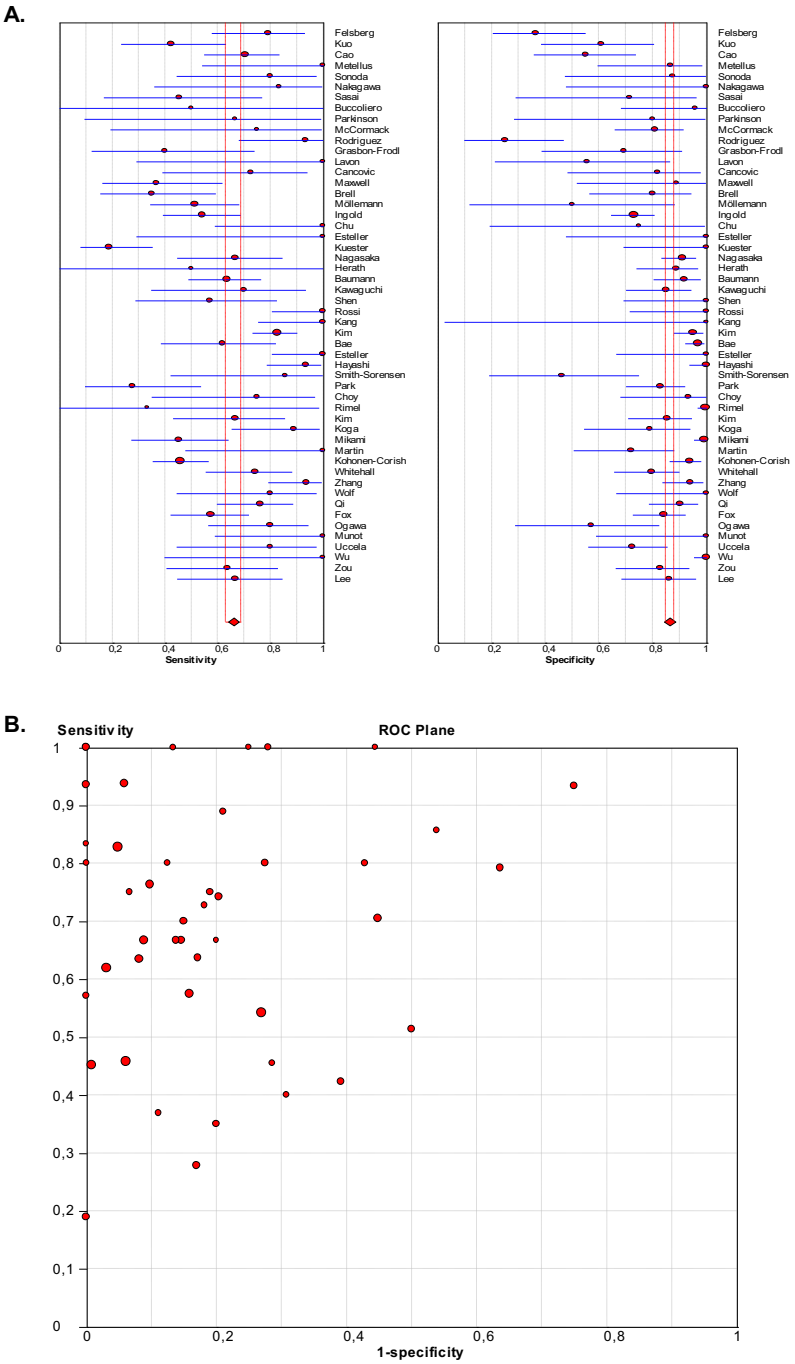


Figure 3 Forest-plots for sensitivity and specificity and ROC Space representation from all elegible studies. (A) Forest-plots for sensitivity and specificity with corresponding 95% CI. (B) ROC Space representation of sensitivity against (1-specificity) for each study.

square = 300.84; df = 48 ($p < 0.0001$), $I^2 = 84\%$), positive LR (Cochrane-Q = 265.33; df = 48 ($p < 0.0001$), $I^2 = 81.9\%$), negative LR (Cochrane- Q = 201.46; df = 48 ($p < 0.0001$), $I^2 = 76.2\%$), and diagnostic odds ratio (Cochrane-Q = 143.88; df = 48 ($p < 0.0001$), $I^2 = 66.6\%$), thus suggesting other sources of heterogeneity across the studies. Accordingly, meta-regression analysis with the following covariates was performed: 1) type of tissue used for MSP, as paraffin embedded specimens may not yield enough quality DNA to successfully perform the test [86]; 2) anti-MGMT antibody used, as the best agreement between MSP and IHC results seems to be achieved when using the MT23.2 antibody [33]; and 3) type of tumour analyzed. Results suggest that the

type of tumour is strongly associated with accuracy (RDOR 5.36; 95% CI[2.42-11.86], p < 0.01) (Additional file 7).

In the next step, a second meta-regression analysis was performed for the subgroup of 36 studies in which semi-quantitative scoring for IHC was used, and the *cut-off* value was also included as covariate. Interestingly, the type of tumour (primary brain tumour *vs*. others) was also selected as an independent covariate of accuracy estimates beyond *cut-off* value, type of tissue or type of antibody used. MGMT protein expression by IHC for brain tumours is associated with a more than four-fold lower accuracy compared to other tumours (RDOR 4.38; 95% CI[1.82-10.54], p = 0.0017) (Additional file 8).

The final step of the analysis was pooling accuracy estimates in homogeneous subgroups of studies with identical type of tumour and identical *cut-off* value. To rule out an implicit threshold effect due to naturally occurring variations in the interpretation between observers, laboratories or devices, the Spearman rank correlation was performed, and no evidence of threshold effect within these groups was found. Overall, the summary estimates found ranged from 0.53; 95% CI[0.33-0.73] to 0.79; 95% CI[0.73-0.84] for sensitivity and from 0.60; 95%CI[0.52-0.67] to 0.93; 95%CI[0.91-0.95] for specificity (Additional file 9).

To further evaluate diagnostic accuracy for MGMT protein expression by IHC when identical scoring and *cut-off* values were used, we determined the Q*index. Figures 4A and 4B show that the Q*index was 0.64 and the area under the curve (AUC) 0.68 for brain tumour studies, while the Q*index was 0.80 and the AUC 0.87 for non-brain tumour series, indicating a statistically significant higher level of overall accuracy in systemic tumours (z-statistic 4.354, p < 0.0001). This difference remained statistically significant when we included all studies in the analysis (z-statistic 5.722, p < 0.0001).

Finally, the Egger's regression test for the detection of publication bias showed an asymmetrical distribution of the points in the funnel-plot (Intercept 1.55; 95%CI [0.61-2.49], p = 0.002) (Figure 5), indicating a potential publication bias.

Discussion

The relevance of MGMT status as a potential prognostic or predictive factor in malignant glioma patients is supported by a number of independent studies. At present, detection of *MGMT* promoter methylation by MSP is the most commonly used method and for this reason it is considered the reference test in the present review. However, concerning day-to-day clinical practice, MSP is not yet part of the routine diagnostic work-up while MGMT assessment at RNA or protein-level are used [22,33]. The exact incidence of promoter methylation, protein or RNA expression varies according to the assessment test and among different studies [87]. An optimal method for diagnostic purposes should be widely available, easy to establish, cost-effective, reproducible both within a given laboratory and among different laboratories, and capable of yielding results that show consistent association with patient outcome [19,33]. In this regard MSP is a highly sensitive qualitative technique, but IHC has several advantages over it [88].

Although strong agreement between MSP and IHC has been previously reported, there is growing evidence that *MGMT* promoter methylation assessment through MSP does not correlate well with MGMT protein expression as detected by IHC in brain tumours [25,26,31,68,89]. In addition, some studies have shown that *MGMT* promoter methylation and MGMT protein expression cannot be used interchangeably to predict patient survival or glioma chemosensitivity [68,90]. Results from the present meta-analysis support this evidence and suggest that cases selected by IHC may not always correspond to those selected by MSP. In fact, diagnostic accuracy estimates for MGMT protein expression by IHC were significantly lower for brain tumours than for other non-brain tumours (sensitivity, 53-64% vs. 60-81% respectively; specificity, 60-84% vs. 80-93% respectively). Similarly, positive and negative likelihood ratios did not provide convincing diagnostic accuracy for IHC in brain tumours (Additional file 9). Accordingly, the type of tumour (primary brain *vs*. non-brain systemic tumour) turned out to be an independent covariate of accuracy estimates in the meta-regression analysis beyond other methodological covariates such as *cut-off* value and type of antibody.

The reasons for these findings are not clear and different putative causes must be taken into consideration. First, there is a lack of a consistently defined *cut-off* value for the semiquantitative immunohistochemical scoring. Capper et al. proposed a *cut-off* of 15% immunolabeled cells for GBM and 35% for low grade gliomas [22], Nakasu et al. proposed a *cut-off* value of 10-20% [88], and Preusser et al. found the best agreement between MSP and IHC results when using a *cut-off* of 50% [20]. It is important to note that the *cut-off* value was not an independent covariate of accuracy in the present meta-regression analysis, whereas the type of tumour (primary brain *vs* non-brain) was independently associated with greater accuracy (Additional files 7 and 8). In addition, interobserver variability in discriminating positive and negative cells, specific immunostaining and background is another technical aspect of the IHC procedure [20]. Even when studies use the same explicit threshold, their implicit threshold may differ, especially if interpretation of the test requires pathology

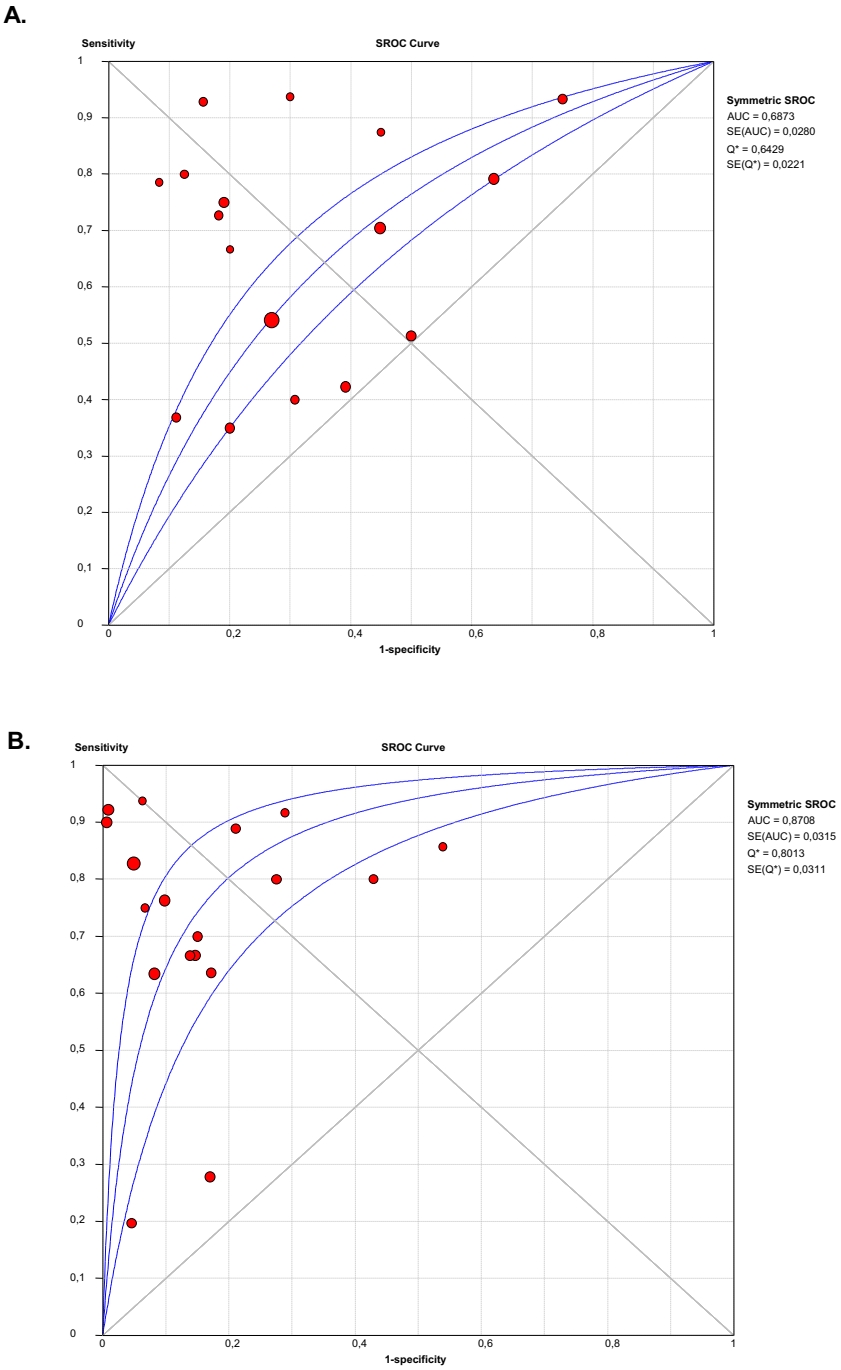


Figure 4 SROC curves for studies with IHC semiquantitative scoring. (A) SROC curve for brain tumour studies with IHC semiquantitative scoring. (B) SROC curve for non-brain tumour studies with IHC semiquantitative scoring.

judgement [35]. Importantly, histological analysis of the tissue used for DNA extraction is not always performed (Additional file 3 and Additional file 4), and when the area of tumour used for MSP analysis is different from the one studied with IHC, necrosis and/or an overlarge sample of normal tissue might hamper the MSP results. Third, due to the fact that MSP relies on the different susceptibility of methylated versus unmethylated cytosines to sodium bisulfite modification and subsequent selective primers amplification, it is highly dependent on tissue quality and quantity, primer design, bisulfite treatment adequacy and PCR conditions [19]. Finally, MSP is so highly sensitive that a methylation band may be obtained even if cells that carry *MGMT* promoter

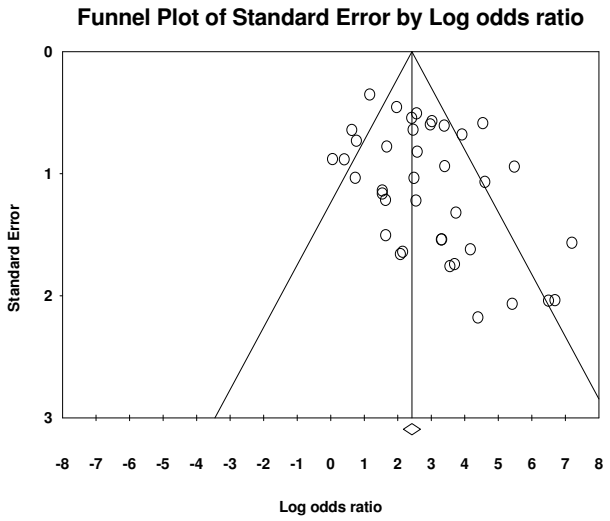


Figure 5 Funnel-plot for the assessment of potential publication bias.

methylation represent a small proportion among the majority of cells with unmethylated promoter [1]. Conversely, IHC may not be able to detect small clusters of cells that have lost protein expression [91].

Apart from these technical issues, there are other confounding factors that may lead to false positive methylation results. Although it has been stated that the presence of a methylated *MGMT* allele can only be attributed to neoplastic cells [8,10,92], some authors have demonstrated that *MGMT* promoter methylation may occur in non-neoplastic central nervous system tissue [3] or in normal-appearing mucosa several centimetres away from digestive tumours [56,93]. Moreover, Candiloro et al. [94] have shown low levels of methylation in peripheral blood of healthy individuals with the T allele of the rs16906252 polymorphism.

Moreover, regulation of MGMT expression in brain tumours seems to be a complex phenomenon in which abnormal methylation of the promoter region may not be the only determining factor [1,47,95-97]. Similar to genetic and chromosomal events, epigenetic changes may also be tissue- and tumour-specific [98,99]. In fact, the inconsistency between promoter methylation and protein expression assessed by IHC in gliomas is not limited to the *MGMT* gene, but has also been observed for other genes such as *PTEN* [100]. Gliomas are heterogeneous tumours and intratumoural heterogeneity of MGMT staining and methylation is a well-known event. Over time, variations in the methylation status of *MGMT* promoter within the same tumour have also been described, although the relevance of these events is unclear [31,89,101]. Interestingly, some factors, such as glucocorticoids, ionizing radiation and chemotherapy, can induce MGMT expression [26,102]. Thus, a further question to be addressed is whether tumour recurrences exhibit the MGMT status as the pre-treatment tumour or a different one. Unfortunately, data on this topic are limited and contradictory [103]. While some studies have demonstrated an increase in MGMT immunostaining [84] or a lower frequency of *MGMT* promoter methylation [87,104,105] in recurrent gliomas after chemotherapy, other authors have not observed any change [84,103,106]. Finally, both an increase and a decrease in MGMT expression have also been described for recurrent tumours [22,76,87,107-109]. A higher protein expression might indicate that the *MGMT* gene has been up-regulated by the treatment, although other possible explanations, such as selection of chemoresistant cells with high MGMT protein levels or intratumoral regional variations, can not be excluded [26,84,109].

Finally, methylation is not biallelic in some tumours, leaving one allele actively expressing the protein while *MGMT* promoter methylation may be also observed [110]. In fact, *MGMT* gene is located on chromosome *10q*, a region lost in the vast majority of GBM, implying that even in those GBM without promoter methylation, *MGMT* haploinsufficiency is likely [101]. Moreover, *MGMT* promoter CpG islands may present a differential pattern of methylation along the region, with some CpGs being more important than others with regard to gene transcription. In this sense, it has been suggested that the region commonly investigated by MSP might not to be among those that best correlate with protein expression [90].

In an attempt to avoid some of the above mentioned problems, quantitative or semiquantitative methods such as MethylLight® quantitative MPS, pyrosequencing, COBRA, etc. [66,67,70,83,87,89,111] have been reported by different groups in recent years. Whether these methods are more appropriate than MSP remains to be demonstrated in large cohorts of patients. Quantitative methods seem to provide better discrimination than classical gel-based MSP. However, as Karayan-Tapon et al. [46] note, before these methods can be used as clinical biomarkers, validation of them is required. Whichever gene is used for normalization, no quantitative-MSP assay can give a real, absolute measurement, and this might be a restriction. Moreover, completely quantitative or semiquantitative assays that normalize to a control gene or the copy number of the unmethylated *MGMT* promoter sequence might underestimate *MGMT* methylation, because contaminating nontumoral tissue will contribute to the signal of the normalizing gene [112].

Both MGMT status at protein level and promoter methylation have been correlated with prognosis and chemosensitivity in glioma patients. As is shown in Additional file 3 and Additional file 4, the prognostic and predictive value of protein expression has been evaluated

in some studies with contradictory results. Several authors have reported a significant association of MGMT expression assessed by immunohistochemistry with patients' overall or progression-free survival [22,23,31,88,113-117]. Some of them have even shown MGMT protein expression to be an independent predictor in the multivariate analysis [31,84,85,115,116,118,119], whilst others have demonstrated a lack of correlation [29,46,58,74]. However, most published data were obtained from heterogeneous groups of patients with different grades and histologies, as well as distinct treatment protocols [31]. Although differences in study design could explain, at least in part, these contradictory results, other possibilities should be considered. In this sense, while those neoplastic cells that do not express MGMT may not be able to correct DNA damage induced by chemotherapy, loss of MGMT expression can also be a negative prognostic factor because of an increased susceptibility to acquiring other mutations [120-122]. Furthermore, due to variable interobserver agreement, insufficient correlation with MGMT promoter methylation status and the lack of a firm association with patient outcome [20,29,103], MGMT IHC has not proved to be a clinically usable biomarker for routine diagnostic purposes and clinical decision-making.

Our review has several limitations. First, we excluded 17 studies because they did not provide data allowing construction of two-by-two tables, potentially resulting in less precise estimates of pooled diagnostic accuracy. Second, the statistical power of this meta-analysis was limited by the relatively small sample size of most included studies. Third, the QUADAS tool revealed that in approximately two-thirds of the studies partial verification bias was not clearly avoided, as not all cases evaluated with the index test went on to receive verification using the reference test. Another important aspect of study quality is the blinding of results of experimental and reference tests [123]. Unfortunately, in 84% of the studies, assessment of the reference test blinded for the IHC results was not explicitly stated by the authors, and in 73% of them no details were reported about blinding of the index test. Finally, publication bias was found in the present meta-analysis. Exclusion of non-English-language studies could contribute to explaining this fact, although a preference for publishing studies reporting positive results is a more plausible explanation [44].

Conclusions

The present systematic review and meta-analysis has shown that assessment of MGMT protein expression by IHC is not in good concordance with results obtained with the MSP test. Discordance between the two tests seems to be higher for brain tumours even when comparing subgroups with identical *cut-off* value. Therefore, it seems that *MGMT* promoter methylation does not always reflect gene expression and, accordingly, the two methods cannot be used interchangeably. We conclude that protein expression assessed by IHC alone fails to reflect the promoter methylation status of *MGMT*, and thus in clinical diagnostic attempts the two methods will not select the same group of patients. This fact can be of crucial importance when stratifying patients in clinical studies according to their MGMT status.

Despite all the above mentioned aspects, MSP currently remains the most established method and the best approach to assessing MGMT status. It is also the technique for which the most convincing clinical correlations have been reported and, thus, it should be considered the reference test. Unfortunately, it is a relatively complex and time-consuming method not apt for routine clinical implementation in many centres [19].

However, the analytical and clinical performance of MGMT immunoassaying seems to be inappropriate for routine diagnostic purposes. This fact, along with the lack of a robust association with *MGMT* promoter methylation as demonstrated in the present meta-analysis, precludes its use as a valuable biomarker for clinical decision making. It remains to be determined whether novel anti-MGMT antibodies directed against other epitopes would improve its performance [20].

Accordingly, some authors have suggested the feasibility of using MSP combined with IHC for prognostic and predictive purposes [104,116]. Immunohistochemistry may represent a useful preliminary test to identify methylated cases while MSP should be performed in non-immunoreactive cases to identify truly methylated tumours [70]. Again, this issue deserves further investigation.

Additional material

Additional file 1: Computer-aided search strategy.

Additional file 2: QUADAS items and their interpretation [9,33,124].

Additional file 3: Characteristics of glioma studies selected for full text review [2,18,26,29-31,46,47,58,59,68,71,76,84,85,87,89,115,116,118,119,125-127].

Additional file 4: Additional file 1. Characteristics of non-glioma studies included in the analysis [1,32,63-67,69,70,72-75,77-83,91,95,96,128-139].

Additional file 5: Evaluation of quality of the included studies using the QUADAS tool [1,2,29,31,32,63-85,87,89,91,93,95,96,115,116,118,119,125-133,135-139].

Additional file 6: Tabular results of Sensitivity, Specificity, Likelihood Ratios, and Diagnostic Odds Ratio [1,2,29,31,32,63-87,89,91,95,96,115,116,118,119,125-139].

Additional file 7: Results of meta-regression analysis for all studies.

Additional 8: Results of meta-regression analysis for the subgroup of studies using semiquantitative scoring for IHC assessment.

Additional file 9: Summary of results.

Ackowledgments
We thank G. Frontera of the Investigation Unit, Son Dureta University Hospital, Palma de Mallorca, Spain, for statistical advice, and Tom Yohannan for language assistance.
This study was supported by grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo (Fondo de Investigación Sanitaria 08/1085; Instituto de Salud Carlos III-RETIC RD06/0020/0097) and the Fundación Médica Mútua Madrileña, 2007.

Author details
[1]Department of Neurosurgery, Son Dureta University Hospital, Palma de Mallorca, Spain. [2]Department of Basic Nursing, IDIBELL-Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

Authors' contributions
All authors have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. MB and JI have made the design, review of the literature, and acquisition and analysis of data. They have also contributed to manuscript drafting and have approved its final version. AT has been involved in the interpretation of data, manuscript writing and critical revision, and has also approved the final version.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Received: 12 September 2010 Accepted: 26 January 2011
Published: 26 January 2011

References

1. Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH: **Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers.** *Br J Cancer* 2002, **86**:1888-1892.
2. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG: **Inactivation of the DNA repair gene O^6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia.** *Cancer Res* 1999, **59**:793-797.
3. Jaeckle KA, Eyre HJ, Townsend JJ, Schulman S, Knudson HM, Belanich M, Yarosh DB, Bearman SI, Giroux DJ, Schold SC: **Correlation of tumor O^6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study.** *J Clin Oncol* 1998, **16**:3310-3315.
4. Gerson SL: **Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer.** *J Clin Oncol* 2002, **20**:2388-2399.
5. Jones PA, Laird PW: **Cancer epigenetics comes from age.** *Nat Genet* 1999, **21**:163-167.
6. Robertson KD, Jones PA: **DNA methylation: past, present and furture directions.** *Carcinogenesis* 2000, **21**:461-467.
7. Baylin SB, Herman JG: **DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetic joins genetics.** *Trends Genet* 2000, **16**:168-173.
8. Esteller M, García-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG: **Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.** *N Eng J Med* 2000, **343**:1350-1354.
9. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R: **MGMT gene silencing and benefit from Temozolamide in glioblastoma.** *N Engl J Med* 2005, **352**:997-1003.
10. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Strupp R: **Clinical trial substantiates the predictive value of O6-Metylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with Temozolamide.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**:1871-1874.
11. Crinière E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, Lejeune J, Auger N, Benouaich-Amiel A, Everhard S, Mokhtari K, Polivka M, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Thillet J, Sanson M: **MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities.** *J Neurooncol* 2007, **83**:173-179.
12. Everhard S, Kaloshi G, Crinière E, Benouaich-Amiel A, Lejeune J, Marie Y, Sanson M, Kujas M, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Thillet J: **MGMT Methylation: a marker of response to Temozolamide in low-grade gliomas.** *Ann Neurol* 2006, **60**:740-743.
13. Kamiryo T, Tada K, Shiraishi S, Shinojima N, Kochi M, Ushio Y: **Correlation between promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase gene and prognosis in patients with high-grade astrocytic tumors treated with surgery, radiotherapy, and 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-based chemotherapy.** *Neurosurgery* 2004, **52**:349-357.
14. Watanabe T, Katayama Y, Komine C, Yoshino A, Ogino A, Ohta T, Fukushima T: **O6-Methylguanine-DNA methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course.** *Int J Cancer* 2005, **113**:581-587.
15. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, Eisenhauer E, Belanger K, Brandes AA, Allgeier A, Lacombe D, Stupp R: **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**:29-38.
16. Sadones J, Michotte A, Veld P, Chaskis C, Sciot R, Menten J, Joossens EJ, Strauven T, D'Hondt LA, Sartenaer D, Califice SF, Bierau K, Svensson C, De Greve J, Neyns B: **MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma.** *Eur J Cancer* 2009, **45**:146-153.
17. Shaw RJ, Hall GL, Lowe D, Liloglou T, Field JK, Sloan P, Risk JM: **The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: correlation of quantitative methylation data with gene expression.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008, **134**:251-256.
18. Preusser M, Elezi L, Hainfellner JA: **Reliability and reproducibility of PCR-based testing of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) promoter methylation status in formalin-fixed and paraffin-embedded neurosurgical biopsy specimens.** *Clin Neuropathol* 2008, **27**:388-390.
19. Yip S, Iafrate AJ, Louis DN: **Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: a practical update on predictive markers.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2008, **67**:1-15.
20. Preusser M, Charles JR, Felsberg J, Reifenberger G, Hamou MF, Diserens AC, Stupp R, Gorlia T, Marosi C, Heinzl H, Hainfellner JA, Hegi M: **Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker.** *Brain Pathol* 2008, **18**:520-532.
21. Andersson U, Malmer B, Bergenheim AT, Brännström T, Henriksson R: **Heterogeneity in the expression of markers for drug resistance in brain tumors.** *Clin Neuropathol* 2004, **23**:21-27.
22. Capper D, Mittelbronn M, Meyermann R, Schittenhelm J: **Pitfalls in the assessment of MGMT expression and its correlation with survival in diffuse astrocytomas: proposal of feasible immunohistochemical approach.** *Acta Neuropathol* 2008, **115**:249-259.
23. Chinot OL, Barrie M, Fuentes S, Eudes N, Lancelot S, Metellus P, Muracciole X, Braguer D, Ouafik L, Martin PM, Dufour H, Figarella-Branger D: **Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide.** *J Clin Oncol* 2007, **25**:1470-1475.
24. Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, Dugan M, Bigner SH, Henry AJ, Ashley DM, Krischer J, Lovell S, Rasheed K, Marchev F, Seman AJ, Cokgor I, Rich J, Stewart E, Colvin OM, Provenzale JM, Bigner DD, Haglund MM, Friedman AH, Modrich PL: **DNA Mismatch repair and O6-alkyguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma.** *J Clin Oncol* 1998, **16**:3851-3857.
25. Idbaih A, Omuro A, Ducray F, Hoang-Xuan K: **Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas.** *Curr Opin Oncol* 2007, **19**:606-611.
26. Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, Errami A, Sijben A, Boots-Sprenger SH, Wesseling P: **MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas.** *Lab Invest* 2007, **87**:1055-1065.
27. McLendon RE, Cleveland L, Pegram C, Bigner SH, Bigner DD, Friedman HS: **Immunohistochemical detection of the DNA repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase in formalin-fixed, paraffin-embedded astrocytomas.** *Lab Invest* 1998, **78**:643-644.
28. Pollack IF, Hamilton RL, Sobol RW, Burnham J, Yates AJ, Holmes EJ, Zhou T, Finlay JL: **O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression strongly**

correlates with outcome in childhood malignant gliomas: results from the CCG-945 Cohort. *J Clin Oncol* 2006, **24**:3431-3437.
29. Rodriguez FJ, Thibodeau SN, Jenkins RB, Schowalter KV, Caron BL, O'Neil BP, James CD, Passe S, Slezak J, Giannini C: **MGMT Immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma.** *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008, **16**:59-65.
30. Yachi K, Watanabe T, Ohta T, Fukushima T, Yoshino A, Ogino A, Katayama Y, Nagase H: **Relevance of MSP assay for the detection of MGMT promoter hypermethylation in glioblastomas.** *Int J Oncol* 2008, **33**:469-475.
31. Brell M, Tortosa A, Verger E, Gil JM, Viñolas N, Villà S, Acebes JJ, Caral Pons JJ, Pujol T, Ferrer I, Ribalta T, Graus F: **Prognostic significance of O6 - Methilguanine DNA methyltransferase determined by promoter methylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:5167-5171.
32. Ingold B, Schraml P, Heppner FL, Moch H: **Homogeneous MGMT immunoreactivity correlates with an unmethylated MGMT promoter status in brain metastases of various solid tumors.** *PLoS ONE* 2009, **4**: e4775.
33. Preusser M: **MGMT analysis at DNA, RNA and protein levels in glioblastoma tissue.** *Histol Histopathol* 2009, **24**:511-518.
34. Leeflang MM, Deeks JJ, Gatsonis C, Bossuyt PM: **Systematic reviews of diagnostic test accuracy.** *Ann Intern Med* 2008, **149**:889-897.
35. Irwig L, Tosteson AN, Gatsonis C, Lau J, Colditz G, Chalmers TC, Mosteller F: **Guidelines for meta-analyses evaluating diagnostic tests.** *Ann Intern Med* 1994, **120**:667-676.
36. Deville WL, Buntinx F, Bouter LM, Montori VM, de Vet HC, van der Windt DA, bezemer PD: **Conducting systematic reviews of diagnostic studies: didactic guidelines.** *BMC Med Res Methodol* 2002, **2**:9.
37. Virgili G, Conti AA, Murro V, Gensini GF, Gusinu R: **Systematic reviews of diagnostic test accuracy and the Cochrane collaboration.** *Intern Emerg Med* 2009, **4**:255-258.
38. Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, Bossuyt PM, Kleijnen J: **The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews.** *BMC Med Res Methodol* 2003, **3**:25.
39. Berman NG, Parker RA: **Meta-analysis: neither quick nor easy.** *BMC Med Res Methodol* 2002, **2**:10.
40. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Lijmer JG, Moher D, Rennie D, de Vet HC: **Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: The STARD Initiative.** *Ann Intern Med* 2003, **138**:40-44.
41. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bonsel GJ, Bossuyt PM: **The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance.** *J Clin Epidemiol* 2003, **56**:1129-1135.
42. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG: **Measuring inconsistency in meta-analyses.** *BMJ* 2003, **327**:557-560.
43. Sterne JA, Egger M: **Funnel plots for detecting bias in meta-analysis: guidelines on choice of axis.** *J Clin Epidemiol* 2001, **54**:1046-1055.
44. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C: **Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test.** *BMJ* 1997, **315**:629-634.
45. Zamora J, Abraira V, Muriel A, Khan K, Coomarasamy A: **Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data.** *BMC Med Res Methodol* 2006, **6**:31.
46. Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, Wager M, Fromont G, Saikali S, Etcheverry A, Hamlat A, Loussouarn D, Campion L, Campone M, Vallette FM, Gratas-Rabbia C: **Prognostic value of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods.** *J Neurooncol* 2010, **97**:311-322.
47. Rood BR, Zhang H, Cogen PH: **Intercellular heterogeneity of expression of the MGMT DNA repair gene in pediatric medulloblastoma.** *Neuro-Oncology* 2004, **6**:200-207.
48. Zhang D, Bai Y, Wang Y, Luo J, Ge Q, Qiao Y, Jia C, Lu Z: **Detailed methylation patterns and protein expression profiles of MGMT in colorectal carcinoma surgical margins.** *Clin Biochem* 2008, **41**:19-25.
49. Voelter V, Diserens AC, Moulin A, Nagel G, Yan P, Migliavacca E, Rimoldi D, Hamou MF, Kaina B, Leyvraz S, Hegi ME: **Infrequent promoter methylation of the MGMT gene in liver metastases from uveal melanoma.** *Int J Cancer* 2008, **123**:1215-1218.
50. Martin P, Garcia-Cosio M, Santon A, Bellas C: **Aberrant gene promoter methylation in plasma cell dyscrasias.** *Exp Mol Pathol* 2008, **84**:256-261.
51. Rietschel P, Wolchok JD, Krown S, Gerst S, Jungbluth AA, Busam K, Smith K, Orlow I, Panageas K, Chapman PB: **Phase II study of extended-dose temozolomide in patients with melanoma.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:2299-2304.
52. Lin Z, Gao M, Zhang X, Kim YS, Lee ES, Kim HK, Kim I: **The hypermethylation and protein expression of p16 INK4A and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2005, **131**:364-370.
53. Furonaka O, Takeshima Y, Awaya H, Kushitani K, Kohno N, Inai K: **Aberrant methylation and loss of expression of O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in pulmonary squamous cell carcinoma and adenocarcinoma.** *Pathol Int* 2005, **55**:303-309.
54. Brock MV, Gou M, Akiyama Y, Muller A, Wu TT, Montgomery E, Deasel M, Germonpré P, Rubinson L, Heitmiller RH, Yang SC, Forastiere AA, Baylin SB, Herman JG: **Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:2912-2919.
55. Nagasaka T, Sharp GB, Notohara K, Kambara T, Sasamoto H, Isozaki H, MacPhee DG, Jass JR, Tanaka N, Matsubara N: **Hypermethylation of O6-Methylguanine-DNA methyltransefarse promoter may predict nonrecurrence after chemotherapy in colorectal cancer cases.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:5306-5312.
56. Zhang L, Lu W, Miao X, Xing D, Tan W, Lin D: **Inactivation of DNA repair gene O6-Methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relation to p53 mutations in esophageal squamous cell carcinoma.** *Carcinogenesis* 2003, **24**:1039-1044.
57. Matsukura S, Soejima H, Nakagawachi T, Yakushiji H, Ogawa A, Fukuhara M, Miyazaki K, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Mukai T: **CpG methylation of MGMT and hMLH1 promoter in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis viral infection.** *Br J Cancer* 2003, **88**:521-529.
58. Mellai M, Caldera V, Annovazzi L, Chio A, Lanotte M, Cassoni P, Finocchiaro G, Schiffer D: **MGMT promoter hypermethylation in a series of 104 glioblastomas.** *Cancer Genomics Proteomics* 2009, **6**:219-227.
59. Yang SH, Kim YH, Kim JW, Park CK, Park SH, Jung HW: **Methylation status of the O6-Methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase gene promoter in World Health Organization grade III gliomas.** *J Korean Neurosurg Soc* 2009, **46**:385-388.
60. Herfarth KK, Brent TP, Danam RP, Remack JS, Kodner IJ, Wells SA, Goodfellow PJ: **A specific CpG methylation pattern of the MGMT promoter region associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers.** *Mol Carcinog* 1999, **24**:90-98.
61. Yin D, Xie D, Hofmann WK, Zhang W, Asotra K, Wong R, Black KL, Koeffler HP: **DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase: promoter hypermethylation associated with decreased expression and G:C to A:T mutations of p53 in brain tumors.** *Mol Carcinog* 2003, **36**:23-31.
62. Lazcoz P, Munoz J, Nistal M, Pestana A, Encio IJ, Castresana JS: **Loss of heterozygosity and microsatellite instability on chromosome arm 10q in neuroblastoma.** *Cancer Genet Cytogenet* 2007, **174**:1-8.
63. Qi J, Zhu YQ, Huang MF, Yang D: **Hypermethylation of CpG island in O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene was associated with K-ras G to A mutation in colorectal tumor.** *World J Gastroenterol* 2005, **11**:2022-2025.
64. Rimel BJ, Huettner P, Powell MA, Mutch DG, Goodfellow PJ: **Absence of MGMT promoter methylation in endometrial cancer.** *Gynecol Oncol* 2009, **112**:224-228.
65. McCormack AI, McDonald KL, Gill AJ, Clark SJ, Burt MG, Campbell KA, Braund WJ, Little NS, Cook RJ, Grossman AB, Robinson BG, Clifton-Bligh RJ: **Low O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression and response to temozolomide in aggressive pituitary tumours.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009, **71**:226-233.
66. Nagasaka T, Goel A, Notohara K, Takahata T, Sasamoto H, Uchida T, Nishida N, Tanaka N, Boland CR, Matsubara N: **Methylation pattern of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis.** *Int J Cancer* 2008, **122**:2429-2436.
67. Baumann S, Keller G, Puhringer F, Napieralski R, Feith M, Langer R, Hofler H, Stein HJ, Sarbia M: **The prognostic impact of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) promotor hypermethylation in esophageal adenocarcinoma.** *Int J Cancer* 2006, **119**:264-268.
68. Maxwell JA, Johnson SP, Quinn A, McLendon RE, Ali-Osman F, Friedman AH, Herndon JE II, Bierau K, Bigley J, Bigner DD, Friedman HS:

Quantitative analysis of O6-alkylguanine-DNA alkyltransefarse in malignant glioma. *Mol Cancer Ther* 2006, **5**:2531-2539.
69. Chu LC, Eberhart CG, Grossman SA, Herman JG: **Epigenetic silencing of multiple genes in primary CNS lymphoma.** *Int J Cancer* 2006, **119**:2487-2491.
70. Uccella S, Cerutti R, Placidi C, Marchet S, Carnevali I, Bernasconi B, Proserpio I, Pinotti G, Tibiletti MG, Furlan D, Capella C: **MGMT methylation in diffuse large B-cell lymphoma: validation of quantitative methylation-specific PCR and comparison with MGMT protein expression.** *J Clin Pathol* 2009, **62**:715-723.
71. Möllemann 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**:379-385.
72. Munot K, Bell SM, Lane S, Horgan K, Hanby AM, Speirs V: **Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer.** *Hum Pathol* 2006, **37**:989-999.
73. Wolf P, Hu YC, Doffek K, Sidransky D, Ahrendt SA: **O(6)- Methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer.** *Cancer Res* 2001, **61**:8113-8117.
74. Lee GW, Kang JH, Kim IS, Kim HG, Ko GH, Lee JH, Kim DC, Song DH, Yang JW, Lee JS: **Is inactivation of O(6)-methylguanine DNA methyltransferase still a favorable prognostic factor of patients with diffuse large B-cell lymphoma in the era of R-CHOP chemotherapy?** *Leuk Lymphoma* 2009, **50**:1992-1998.
75. Herath NI, Walsh MD, Kew M, Smith JL, Jass JR, Young J, Leggett BA, Macdonald GA: **Silencing of O6-methylguanine DNA methyltransferase in the absence of promoter hypermethylation in hepatocellular carcinomas from Australia and South Africa.** *Oncol Rep* 2007, **17**:817-822.
76. Lavon I, Zrihan D, Zelikovitch B, Fellig Y, Fuchs D, Soffer D, Siegal T: **Longitudinal assessment of genetic and epigenetic markers in oligodendrogliomas.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:1429-1437.
77. Martin P, Santon A, Garcia-Cosio M, Bellas C: **hMLH1 and MGMT inactivation as a mechanism of tumorigenesis in monoclonal gammopathies.** *Mod Pathol* 2006, **19**:914-921.
78. Ogawa T, Yoshida T, Tsuruta T, Saigenji K, Okayasu I: **Genetic instability on chromosome 17 in the epithelium of non-polypoid colorectal carcinomas compared to polypoid lesions.** *Cancer Sci* 2006, **97**:1335-1342.
79. Rossi D, Capello D, Gloghini A, Franceschetti S, Paulli M, Saglio G, Vitolo U, Pileri SA, Esteller M, Carbone A, Gaidano G: **Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia.** *Haematologia* 2004, **89**:154-164.
80. Kim SH, Bae SI, Lee HS, Kim WH: **Alteration of O6-methylguanie-DNA methyltransferase in colorectal neoplasms in sporadic and familial adenomatous polyposi patients.** *Mol Carcinog* 2003, **37**:32-38.
81. Choy KW, Pang CP, To KF, Yu C, Ng JSK, Lam DSC: **Impaired expression and promotor hypermethylation of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase in retinoblastoma tissues.** *Invest Ophthalmol Vis Sci (PA)* 2002, **43**:1344-1349.
82. Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA, Jass JR: **Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability.** *Cancer Res* 2001, **61**:827-830.
83. Wu PF, Kuo KT, Kuo LT, Lin YT, Lee WC, Lu YS, Yang CH, Wu RM, Tu YK, Tasi JC, Tseng HM, Tseng SH, Cheng AL, Lin CH: **O(6)- Methylguanine-DNA methyltransferase expression and prognostic value in brain metastases of lung cancers.** *Lung Cancer* 2010, **68**:484-490.
84. Metellus P, Coulibaly B, Nanni I, Fina F, Eudes N, Giorgi R, Barrie M, Chinot O, Fuentes S, Dufour H, Ouafik L, Figarella-Branger D: **Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort.** *Cancer* 2009, **115**:4783-4794.
85. Sonoda Y, Kumabe T, Watanabe M, Nakazato Y, Inoue T, Kanamori M, Tominaga T: **Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis.** *Acta Neurochir (Wien)* 2009, **151**:1349-1358.
86. Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hubner A, Ehrentraut D, Schramm J, Felsberg J, Kahl P, Buttner R, Pietsch T, Waha A: **Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis.** *J Mol Diagn* 2007, **9**:368-381.
87. Parkinson JF, Wheeler HR, Clarkson A, Mckenkie CA, Biggs MT, Little NS, Cook RC, Messina M, Robinson BG, McDonald KL: **Variation of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples of glioblastoma.** *J Neurooncol* 2008, **87**:71-78.
88. Nakasu S, Fukami T, Baba K, Matsuda M: **Immunohistochemical study for O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in the non-neoplastic and neoplastic components of gliomas.** *J Neurooncol* 2004, **70**:333-340.
89. Grasbon-Frodl EM, Kreth FW, Ruiter M, Schnell O, Bise K, Felsberg J, Reifenberg G, Tonn JC, Kretzschmar HA: **Intratumoral homogeinity of MGMT promoter hypermetilation as demonstrated in serial stereotactic specimens for anaplastic astrocytomas and glioblastomas.** *Int J Cancer* 2007, **121**:2458-2464.
90. Everhard S, Tost J, El AH, Criniere E, Busato F, Marie Y, Gut IG, Sanson M, Mokhtari K, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Thillet J: **Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas.** *Neuro Oncol* 2009, **11**:348-356.
91. Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, Chan C, Lin BP, Kwun SY, Dent OF, Dhillon VS, Trent RJ, Chapuis PH, Bokey EL: **Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer.** *J Clin Oncol* 2005, **23**:2318-2324.
92. Stupp R: **Methylguanine methyltransefrase testing in glioblastoma: when and how?** *J Clin Oncol* 2007, **25**:1459-1460.
93. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Supunpong Hernandez N, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR, Issa J-PJ: **MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2005, **97**:1330-1338.
94. Candiloro IL, Dobrovic A: **Detection of MGMT promoter methylation in normal individuals is strongly associated with the T allele of the rs16906252 MGMT promoter single nucleotide polymorphism.** *Cancer Prev Res (Phila)* 2009, **2**:862-867.
95. Park TJ, Han SU, Cho YK, Paik WK, Kim YB, Lim IK: **Methylation of O6-Methylguanine-DNA methyltransferase gene is associated significantly with K-ras mutation, lymph node invasion, tumor staging, and disease free survival in patients with gastric carcinoma.** *Cancer* 2001, **92**:2760-2768.
96. Smith-Sorensen B, Lind GE, Skotheim RI, Fossa SD, Fodstad O, Stenwig A-E, Jakobsen KS, Lothe RA: **Frequent promoter hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer.** *Oncogene* 2002, **21**:8878-8884.
97. Bhakat KK, Mitra S: **CpG methylation-dependent repression of the human O6-Methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration.** *Carcinogenesis* 2003, **24**:1337-1345.
98. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG: **A gene hypermethylation profile of human cancer.** *Cancer Res* 2001, **61**:3225-3229.
99. Lorente A, Mueller W, Urdangarin E, Lazcoz P, Lass U, von Deimling A, Castresana JS: **RASSF1A, BLU, NORE1A, PTEN and MGMT expression and promoter methylation in gliomas and glioma cell lines and evidence of deregulated expression of de novo DNMTs.** *Brain Pathol* 2009, **19**:279-292.
100. Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: **PTEN methylation and expression in glioblastomas.** *Acta Neuropathol* 2003, **106**:479-485.
101. Iafrate AJ, Louis DN: **"MGMT for pt mgmt": is Methylguanine-DNA Methyltransferase testing ready for patient management?** *J Mol Diagn* 2008, **10**:308-310.
102. Fritz G, Tano K, Mitra S, Kaina B: **Inducibility of the DNA repair gene encoding O6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments.** *Mol Cell Biol* 1991, **11**:4660-4668.
103. Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, Batchelor TT, Futreal PA, Stratton MR, Curry WT, Iafrate AJ, Louis DN: **Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:2038-2045.
104. Christmann M, Nagel G, Horn S, Krahn U, Wiewrodt D, Sommer C, Kaina B: **MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma.** *Int J Cancer* 2010, **127**:2106-2118.
105. Eoli M, Menghi F, Bruzzone MG, De ST, Valletta L, Pollo B, Bissola L, Silvani A, Bianchessi D, D'Incerti L, Filippini G, Broggi G, Boiardi A, Finocchiaro G: **Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:2606-2613.

106. Jung TY, Jung S, Moon KS, Kim IY, Kang SS, Kim YH, Park CS, Lee KH: **Changes of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma.** *Oncol Rep* 2010, **23**:1269-1276.
107. Nagane M, Kobayashi K, Ohnishi A, Shimizu S, Shiokawa Y: **Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression in patients with recurrent glioblastoma treated with temozolomide.** *Jpn J Clin Oncol* 2007, **37**:897-906.
108. Wiewrodt D, Nagel G, Dreimuller N, Hundsberger T, Perneczky A, Kaina B: **MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome.** *Int J Cancer* 2008, **122**:1391-1399.
109. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Bartolini S, Bacci A, Agati R, Ghimenton C, Turazzi S, Talacchi A, Skrap M, Marucci G, Volpin L, Morandi L, Pizzolitto S, Gardiman M, Andreoli A, Calbucci F, Ermani M: **O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications.** *Neuro Oncol* 2010, **12**:283-288.
110. Parkinson JF, Wheeler HT, McDonald KL: **Contribution of DNA repair mechanisms to determining chemotherapy response in high-grade glioma.** *J Clin Neurosci* 2008, **15**:1-8.
111. Candiloro IL, Mikeska T, Hokland P, Dobrovic A: **Rapid analysis of heterogeneously methylated DNA using digital methylation-sensitive high resolution melting: application to the CDKN2B (p15) gene.** *Epigenetics Chromatin* 2008, **1**:7.
112. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME: **MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?** *Nat Rev Neurol* 2010, **6**:39-51.
113. Anda T, Shabani HK, Tsunoda K, Tokunaga Y, Kaminogo M, Shitaba S, Hayashi T, Iseki M: **Relationsip between expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione-S-transferase π in glioblastoma and the survival of the patients treated with nimustine hydrochloride: An immunohistochemical analysis.** *Neurol Res* 2003, **25**:241-248.
114. Nakasu S, Fukami T, Jito J, Matsuda M: **Prognostic significance of loss of O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in supratentorial diffuse low-grade astrocytoma.** *Surg Neurol* 2007, **68**:603-608.
115. Nakagawa T, Ido K, Sakuma T, Takeuchi H, Sato K, Kubota T: **Prognostic significance of the immunohistochemical expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein-1 in glioblastomas.** *Neuropathology* 2009, **29**:388.
116. Cao VT, Jung TY, Jung S, Jin SG, Moon KS, Kim IY, Kang SS, Park CS, Lee KH, Chae HJ: **The correlation and prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas.** *Neurosurgery* 2009, **65**:866-875.
117. Sonoda Y, Yokosawa M, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Tominaga T: **O(6)-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma.** *Int J Clin Oncol* 2010, **15**:352-358.
118. Kuo LT, Kuo KT, Lee MJ, Wei CC, Scaravilli F, Tsai JC, Tseng HM, Kuo MF, Tu YK: **Correlation among pathology, genetic and epigenetic profiles, and clinical outcome in oligodendroglial tumors.** *Int J Cancer* 2009, **124**:2872-2879.
119. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goeppert M, Steiger HJ, Friedensdorf B, Reifenberger G, Sabel MC: **Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:6683-6693.
120. Gerson SL: **MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:296-307.
121. Esteller M, Herman JG: **Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-Methylguanine DNA methyltransferase in human cancer.** *Oncogene* 2004, **23**:1-8.
122. Herman JG, Baylin SB: **Gene silencing in cancer is association with promoter hypermethylation.** *N Engl J Med* 2003, **349**:2042-2054.
123. Deeks JJ: **Systematic reviews in health care: Systematic reviews of evaluations of diagnostic and screening tests.** *BMJ* 2001, **323**:157-162.
124. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, Bijlmer HA, Reitsma JB, Bossuyt PM, Vandenbroucke-Grauls CM: **Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients.** *Cochrane Database Syst Rev* 2008, CD007394.
125. Sasai K, Nodagashira M, Aoyanagi E, Wang L, Katoh M, Murata J, Ozaki Y, Ito T, Fujimoto S, Kaneko S, Nagashima K, Tanaka S: **Careful exclusion of non-neoplastic brain components is required for an appropiate evaluation of O6-methylguanine-DAN methyltransferase status in glioma.** *Am J Surg Pathol* 2008, **32**:1220-1227.
126. Buccoliero AM, Castiglione F, Rossi Deglínnocenti D, Paglierani M, Maio V, Gheri CF, Garbini F, Moncini D, Taddei A, Sardi I, Sanzo M, Giordano F, Mussa F, Genitori L, Taddei GL: **O6-Methylguanine-DNA-Methylytansefrase in recurring anaplastic ependymomas: PCR and immunohistochemistry.** *J Chemother* 2008, **20**:263-268.
127. Cankovic M, Mikkelsen T, Rosenblum ML, Zarbo RJ: **A simplified laboratory validated assay for MGMT promoter hypermethylation analysis of glioma specimens from formalin-fixed paraffin-embedded tissue.** *Lab Invest* 2007, **87**:392-397.
128. Kim JI, Suh JT, Choi KU, Kang HJ, Shin DH, Lee IS, Moon TY, Kim WT: **Inactivation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in soft tissue sarcomas: association with K-ras mutations.** *Hum Pathol* 2009, **40**:934-941.
129. Zou XP, Zhang B, Zhang XQ, Chen M, Cao J, Liu WJ: **Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions.** *Hum Pathol* 2009, **40**:1534-1542.
130. Kuester D, El-Rifai W, Peng D, Ruemmele P, Kroeckel I, Peters B, Moskaluk CA, Stolte M, Monkemuller K, Meyer F, Schulz HU, Hartmann A, Roessner A, Schneider-Stock R: **Silencing of MGMT expression by promoter hypermethylation in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus.** *Cancer Lett* 2009, **275**:117-126.
131. Mikami T, Yoshida T, Numata Y, Shiraishi H, Araki K, Guiot MC, Jass JR, Okayasu I: **Low frequency of promoter methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and hMLH1 in ulcerative colitis-associated tumors: comparison with sporadic colonic tumors.** *Am J Clin Pathol* 2007, **127**:366-373.
132. Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Takahira T, Kobayashi C, Tamiya S, Tateishi N, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M: **DNA hypermethylation status of multiple genes in soft tissue sarcomas.** *Mod Pathol* 2006, **19**:106-114.
133. Fox EJ, Leahy DT, Geraghty R, Mulcahy HE, Fennelly D, Hyland JM, O'Donoghue DP, Sheahan K: **Mutually exclusive promoter hypermethylation patterns of hMLH1 and O6-methylguanine DNA methyltransferase in colorectal cancer.** *J Mol Diagn* 2006, **8**:68-75.
134. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Supunpong Hernandez N, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR, Issa J-PJ: **MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2005, **97**:1330-1338.
135. Koga Y, Kitajima Y, Miyoshi A, Sato K, Kitahara K, Soejima H, Miyazaki L: **Tumor progression through epigenetic gene silencing of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in human biliary tract cancers.** *Ann Surg Oncol* 2005, **12**:354-363.
136. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS: **Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia.** *J Pathol* 2004, **202**:233-240.
137. Zhang YJ, Chen Y, Ahsan H, Lunn RM, Lee PH, Chen CJ, Santella RM: **Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to aflatoxin B1-DNA adducts and p53 mutation in hepatocellular carcinoma.** *Int J Cancer* 2003, **103**:440-444.
138. Esteller M, Gaidano G, Goodman SN, Zagonel V, Capello D, Botto B, Rossi D, Gloghini A, Vitolo U, Carbone A, Baylin SB, Herman JG: **Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma.** *J Natl Cancer Inst* 2002, **94**:26-32.
139. Hayashi H, Yazawa T, Okudela K, Nagai J, Ito T, Kanisawa M, Kitamura H: **Inactivation of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase in human lung adenocarcinoma relates to high-grade histology and worse prognosis among smokers.** *Jpn J Cancer Res* 2002, **93**:184-189.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/35/prepub

doi:10.1186/1471-2407-11-35
Cite this article as: Brell *et al.*: O6-Methylguanine-DNA methyltransferase protein expression by immunohistochemistry in brain and non-brain systemic tumours: systematic review and meta-analysis of correlation with methylation-specific polymerase chain reaction. *BMC Cancer* 2011 **11**:35.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albert, F.K., Forsting, M., Sartor, K., Adams, H.P., Kunze, S. Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objetive evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. Neurosurgery 34:45-61, 1994.

2. Aldape, K., Burger, P.C., Perry, A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. Arch. Pathol. Lab Med. 131:242-251, 2007.

3. Al-Kuraya, K., Narayanappa, R., Siraj, A.K., Al-Dayel, F., Ezzat, A., El, S.H., Al-Jommah, N., Sauter, G., Simon, R. High frequency and strong prognostic relevance of O6-methylguanine DNA methyltransferase silencing in diffuse large B-cell lymphomas from the Middle East. Hum. Pathol. 37:742-748, 2006.

4. Allam, A., Radwi, A., El, W.A., Hassounah, M. Oligodendroglioma: an analysis of prognostic factors and treatment results. Am. J Clin. Oncol. 23:170-175, 2000.

5. Anda, T., Shabani, H.K., Tsunoda, K., Tokunaga, Y., Kaminogo, M., Shitaba, S., Hayashi, T., Iseki, M. Relationsip between expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione-S-transferase p in glioblastoma and the survival of the patients treated with nimustine hydrochloride: An immunohistochemical analysis. Neurol Res. 25:241-248, 2003.

6. Andersson, U., Malmer, B., Bergenheim, A.T., Brännström, T., Henriksson, R. Heterogeneity in the expression of markers for drug resistance in brain tumors. Clin. Neuropathol. 23:21-27, 2004.

7. Argimon Pallás, J.M., Jiménez Villa, J. Revisiones sistemáticas. En: Argimon Pallás, J.M. y Jiménez Villa, J. (Eds.) Métodos de investigación clínica y epidemiológica, Madrid: Elsevier, 2004, pp. 101-109.

8. Argimon Pallás, J.M., Jiménez Villa, J. Análisis de una revisión sistemática. En: Argimon Pallás, J.M. and Jiménez Villa, J. (Eds.) Métodos de investigación clínica y epidemiológica, Madrid: Elsevier, 2004, pp. 347-351.

9. Augustine, C.K., Yoo, J.S., Potti, A., Yoshimoto, Y., Zipfel, P.A., Friedman, H.S., Nevins, J.R., Ali-Osman, F., Tyler, D.S. Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. Clin. Cancer Res. 15:502-510, 2009.

10. Bae, S.I., Lee, H.S., Kim, S.H., Kim, W.H. Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. Br. J. Cancer 86:1888-1892, 2002.

11. Baeza, N., Weller, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. PTEN methylation and expression in glioblastomas. Acta Neuropathol. 106:479-485, 2003.

12. Balaña, C., Ramirez, J.L., Taron, M., Roussos, Y., Ariza, A., Ballester, R., Sarries, C., Mendez, P., Sanchez, J.J. O6-methylguanine-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. 9:1461-1468, 2003.

13. Bartolomei, M., Tilghman, S.M. Genomic imprinting in mammals. Annu. Rev. Genet. 31:493-525, 1997.

14. Bast, R.C., Jr., Lilja, H., Urban, N., Rimm, D.L., Fritsche, H., Gray, J., Veltri, R., Klee, G., Allen, A., Kim, N., Gutman, S., Rubin, M.A., Hruszkewycz, A. Translational crossroads for biomarkers. Clin. Cancer Res. 11:6103-6108, 2005.

15. Bauman, G.S., Ino, Y., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Fisher, B.J., Macdonald, D.R., Stitt, L., Louis, D.N., Cairncross, J.G. Allelic loss of chromosome 1p and radiotherapy plus chemotherapy in patients with oligodendrogliomas. Int. J Radiat. Oncol. Biol. Phys. 48:825-830, 2000.

16. Baumann, S., Keller, G., Puhringer, F., Napieralski, R., Feith, M., Langer, R., Hofler, H., Stein, H.J., Sarbia, M. The prognostic impact of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) promotor hypermethylation in esophageal adenocarcinoma. Int. J Cancer 119:264-268, 2006.

17. Baylin, S.B., Herman, J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetic joins genetics. Trends Genet. 16:168-173, 2000.

18. Baylin, S.B., Herman, J.G. Promoter hypermethylation. Can this change alone ever designate true tumor suppressor gene function? (editorial). J. Natl. Cancer Inst. 93:664-665, 2001.

19. Bearzatto, A., Szadkowski, M., Macpherson, P., Jiricny, J., Karran, P. Epigenetic regulation of the MGMT and hMSH6 DNA repair genes in cells resistant to methylating agents. Cancer Res. 60:3262-3270, 2000.

20. Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., Delattre, J.Y. Primary brain tumours in adults. Lancet 361:323-331, 2003.

21. Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., Beier, C.P. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. Cancer Res. 67:4010-4015, 2007.

22. Beier, D., Rohrl, S., Pillai, D.R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L.A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., Giebel, B., Wischhusen, J., Reifenberger, G., Hau, P., Beier, C.P. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. Cancer Res. 68:5706-5715, 2008.

23. Belanich, M., Pastor, M., Randall, T., Guerra, D., Kibitel, J., Alas, L., Li, B., Citron, M., Wasserman, P., White, A., Eyre, H., Jaeckle, K., Schulman, S., Rector, D., Prados, M., Coons, S., Shapiro, W., Yarosh, D. Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. Cancer Res. 56:783-788, 1996.

24. Belanich, M., Randall, T., Pastor, M., Kick, S.A., Green, L., Dolan, M.E., Schold, S.C.Jr., Gander, M., Lejeune, F.J., Li, B.F.L., White, A.B., Wasserman, P., Citron, M.L., Yarosh, D.B. Intracellular localization and intercellular heterogeneity of the human DNA repair

protein O6-Methylguanine-DNA methyltransferase. Cancer Chemother. Pharmacol. 37:547-555, 1996.

25. Bellail, A.C., Hunter, S.B., Brat, D.J., Tan, C., Van Meir, E.G. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. Int. J Biochem. Cell Biol. 36:1046-1069, 2004.

26. Bello, M.J., Alonso, M.E., Aminoso, C., Anselmo, N.P., Arjona, D., Gonzalez-Gomez, P., Lopez-Marin, I., de Campos, J.M., Gutierrez, M., Isla, A., Kusak, M.E., Lassaletta, L., Sarasa, J.L., Vaquero, J., Casartelli, C., Rey, J.A. Hypermethylation of the DNA repair gene MGMT: association with TP53 G:C to A:T transitions in a series of 469 nervous system tumors. Mutat. Res. 554:23-32, 2004.

27. Bello, L., Francolini, M., Marthyn, P., Zhang, J., Carroll, R.S., Nikas, D.C., Strasser, J.F., Villani, R., Cheresh, D.A., Black, P.M. Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. Neurosurgery 49:380-389, 2001.

28. Bello, M.J., Leone, P.E., Vaquero, J., de Campos, J.M., Kusak, M.E., Sarasa, J.L., Pestaña, A., Rey, J.A. Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. Int. J. Cancer 64:207-210, 1995.

29. Bello, M.J., Vaquero, J., de Campos, J.M., Kusak, M.E., Sarasa, J.L., Saez-Castresana, J., Pestana, A., Rey, J.A. Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in human gliomas reveals frequent loss of 1p in oligodendroglial tumors. Int. J Cancer 57:172-175, 1994.

30. Berger, Y., Bernasconi, C.C., Juillerat-Jeanneret, L. Targeting the endothelin axis in human melanoma: combination of endothelin receptor antagonism and alkylating agents. Exp. Biol. Med. (Maywood.) 231:1111-1119, 2006.

31. Berman, N.G., Parker, R.A. Meta-analysis: neither quick nor easy. BMC. Med. Res. Methodol. 2:10, 2002.

32. Bhakat, K.K., Mitra, S. Regulation of the human O6-Methylguanine-DNA methyltransferase gene by transcriptional coactivators cAMP response element-binding protein-binding protein and p300. J. Biol. Chem. 275:34197-34204, 2000.

33. Bhakat, K.K., Mitra, S. CpG methylation-dependent repression of the human O6-Methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration. Carcinogenesis 24:1337-1345, 2003.

34. Bignami, M., O'Driscoll, M., Aquilina, G., Karran, P. Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. Mutat. Res. 462:71-82, 2000.

35. Bigner, S.H., Matthews, M.R., Rasheed, B.K., Wiltshire, R.N., Friedman, H.S., Friedman, A.H., Stenzel, T.T., Dawes, D.M., McLendon, R.E., Bigner, D.D. Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. Am. J Pathol. 155:375-386, 1999.

36. Biswas, T., Ramana, C.V., Srinivasan, G., Boldogh, I., Hazra, T., Chen, Z., Tano, K., Thompson, E.B., Mitra, S. Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. Oncogene 18:525-532, 1999.

37. Blanc, J.L., Wager, M., Guilhot, J., Kusy, S., Bataille, B., Chanteraeau, T., Lapierre, F., Larsen, C.J., Karayan-Tapon, L. Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. J. Neurooncol. 68:275-283, 2004.

38. Blesa, D., Mollejo, M., Ruano, Y., de Lope, A.R., Fiano, C., Ribalta, T., Garcia, J.F., Campos-Martin, Y., Hernandez-Moneo, J.L., Cigudosa, J.C., Melendez, B. Novel genomic alterations and mechanisms associated with tumor progression in oligodendroglioma and mixed oligoastrocytoma. J Neuropathol. Exp. Neurol. 68:274-285, 2009.

39. Blough, M.D., Zlatescu, M.C., Cairncross, J.G. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells. Cancer Res. 67:580-584, 2007.

40. Bobola, M.S., Berger, M.S., Ellenbogen, R.G., Roberts, T.S., Geyer, J.R., Silber, J.R. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in pediatric primary brain tumors: relation to patient and tumor characteristics. Clin. Cancer Res. 7:613-619, 2001.

41. Bobola, M.S., Berger, M.S., Silber, J.R. Contribution of O6-Methylguanine-DNA methyltransferase to resistance to 1,3-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in human brain tumor-derived cell lines. Mol. Carcinog. 13:81-88, 1995.

42. Bocangel, D.B., Finkelstein, S., Schold, S.C., Bhakat, K.K., Mitra, S., Kokkinakis, D.M. Multifaceted resistance of gliomas to Temozolamide. Clin. Cancer Res. 8:2725-2734, 2002.

43. Boldogh, I., Ramana, C.V., Chen, Z., Biswas, T., Hazra, T.K., Grosch, S., Grombacher, T., Mitra, S., Kaina, B. Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling. Cancer Res. 58:3950-3956, 1998.

44. Bossuyt, P.M., Reitsma, J.B., Bruns, D.E., Gatsonis, C.A., Glasziou, P.P., Irwig, L.M., Lijmer, J.G., Moher, D., Rennie, D., de Vet, H.C. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: The STARD Initiative. Ann. Intern. Med. 138:40-44, 2003.

45. Bozboga, M., Canbolat, A., Savas, A., Turker, K. Aneurysm arising from the medial branch of the superior cerebellar artery. Acta Neurochir. (Wien.) 138:1013-1014, 1996.

46. Brabender, J., Usadel, H., Metzger, R., Schneider, P.M., Park, J., Salonga, D., Tsao-Wei, D.D., Groshen, S., Lord, R.V., Takebe, N., Schneider, S., Hölscher, A.H., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V. Quantitative O6-Methylguanine DNA-methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome. Clin. Cancer Res. 9:223-227, 2003.

47. Brandes, A.A., Franceschi, E., Tosoni, A., Bartolini, S., Bacci, A., Agati, R., Ghimenton, C., Turazzi, S., Talacchi, A., Skrap, M., Marucci, G., Volpin, L., Morandi, L., Pizzolitto, S., Gardiman, M., Andreoli, A., Calbucci, F., Ermani, M. O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed

glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. Neuro. Oncol. 12:283-288, 2010.

48. Brandes, A.A., Franceschi, E., Tosoni, A., Benevento, F., Scopece, L., Mazzocchi, V., Bacci, A., Agati, R., Calbucci, F., Ermani, M. Temozolomide concomitant and adjuvant to radiotherapy in elderly patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status. Cancer 115:3512-3518, 2009.

49. Brandes, A.A., Franceschi, E., Tosoni, A., Blatt, V., Pession, A., Tallini, G., Bertorelle, R., Bartolini, S., Calbucci, F., Andreoli, A., Frezza, G., Leonardi, M., Spagnolli, F., Ermani, M. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. J Clin. Oncol. 26:2192-2197, 2008.

50. Brandes, A.A., Tosoni, A., Cavallo, G., Bertorelle, R., Gioia, V., Franceschi, E., Biscuola, M., Blatt, V., Crino, L., Ermani, M. Temozolomide 3 weeks on and 1 week off as first-line therapy for recurrent glioblastoma: phase II study from gruppo italiano cooperativo di neuro-oncologia (GICNO). Br. J Cancer 95:1155-1160, 2006.

51. Brandes, A.A., Tosoni, A., Cavallo, G., Reni, M., Franceschi, E., Bonaldi, L., Bertorelle, R., Gardiman, M., Ghimenton, C., Iuzzolino, P., Pession, A., Blatt, V., Ermani, M. Correlations between O6-Methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to Temozolamide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study. J. Clin. Oncol. 24:4746-4753, 2006.

52. Brandes, A.A., Tosoni, A., Franceschi, E., Sotti, G., Frezza, G., Amista, P., Morandi, L., Spagnolli, F., Ermani, M. Recurrence pattern after temozolomide concomitant with and adjuvant to radiotherapy in newly diagnosed patients with glioblastoma: correlation With MGMT promoter methylation status. J Clin. Oncol. 27:1275-1279, 2009.

53. Brandsma, D., van den Bent, M.J. Molecular targeted therapies and chemotherapy in malignant gliomas. Curr. Opin. Oncol. 19:598-605, 2007.

54. Brell, M., Ibanez, J., Caral, L., Ferrer, E. Factors influencing surgical complications of intra-axial brain tumours. Acta Neurochir. (Wien.) 142:739-750, 2000.

55. Brell, M., Tortosa, A., Verger, E., Gil, J.M., Viñolas, N., Villà, S., Acebes, J.J., Caral Pons, J.J., Pujol, T., Ferrer, I., Ribalta, T., Graus, F. Prognostic significance of O6-Methilguanine.DNA methyltransferase determined by promoter methylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. Clin. Cancer Res. 11:5167-5171, 2005.

56. Brock, M.V., Gou, M., Akiyama, Y., Muller, A., Wu, T.T., Montgomery, E., Deasel, M., Germonpré, P., Rubinson, L., Heitmiller, R.H., Yang, S.C., Forastiere, A.A., Baylin, S.B., Herman, J.G. Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma. Clin. Cancer Res. 9:2912-2919, 2003.

57. Buccoliero, A.M., Arganini, L., Ammannati, F., Gallina, P., Di, L.N., Mennonna, P., Taddei, G.L. Oligodendrogliomas lacking O6-methylguanine-DNA-methyltransferase expression. J Chemother. 17:321-326, 2005.

58. Buccoliero, A.M., Castiglione, F., Rossi Deglínnocenti, D., Paglierani, M., Maio, V., Gheri, C.F., Garbini, F., Moncini, D., Taddei, A., Sardi, I., Sanzo, M., Giordano, F., Mussa, F., Genitori, L., Taddei, G.L. O6-Methylguanine-DNA-Methylytansefrase in recurring anaplastic ependymomas: PCR and immunohistochemistry. J. Chemother. 20:263-268, 2008.

59. Buckner, J.C. Factors influencing survival in high-grade gliomas. Semin. Oncol. 30:10-14, 2003.

60. Buckner, J.C., Moynihan, T.J., Quinn, D.I., Schlegel, U., Ali-Osman, F., Srivenugopal, K., Sawaya, R. The DNA-Repair gene MGMT and clinical response of gliomas to alkylating agents (carta). N. Engl. J. Med. 344:686-687, 2001.

61. Burger, P.C., Green, S.B. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. Cancer 59:1617-1625, 1987.

62. Burger, P.C., Minn, Y.A., Smith, J.S., Borell, T.J., Jedlicka, A.E., Huntley, B.K., Goldthwaite, P.T., Jenkins, R.B., Feuerstein, B.G. Losses of chromosomal arms 1p and 19q in the diagnosis of oligodendroglioma. A study of paraffin-embedded sections. Mod. Pathol. 14:842-853, 2001.

63. Burnet, N.G., Jefferies, S.J., Benson, R.J., Hunt, D.P., Treasure, F.P. Years of life lost (YLL) from cancer is an important measure of population burden and should be considered when allocating research funds. Br. J Cancer 92:241-245, 2005.

64. Byrne, J.H. Synapses. Plastic plasticity. Nature 389:791-792, 1997.

65. Cahill, D.P., Levine, K.K., Betensky, R.A., Codd, P.J., Romany, C.A., Reavie, L.B., Batchelor, T.T., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Curry, W.T., Iafrate, A.J., Louis, D.N. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. Clin. Cancer Res. 13:2038-2045, 2007.

66. Cairncross, J.G. Imaging molecular signatures in oligodendroglioma (comentario sobre Walker el at., Clin Cancer Res., 10: 7182-7191). Clin. Cancer Res. 10:7109-7111, 2004.

67. Cairncross, J.G., Macdonald, D.R. Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. Ann. Neurol. 23:360-364, 1988.

68. Cairncross, J.G., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Lisle, D.K., Finkelstein, D.M., Hammond, R.R., Silver, J.S., Stark, P.C., Macdonald, D.R., Ino, Y., Ramsay, D.A., Louis, D.N. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. J. Natl. Cancer Inst. 90:1473-1479, 1998.

69. Cameron, E.E., Baylin, S.B., Herman, J.G. p15(INK4B) CpG island methyltion in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. Blood 94:2445-2451, 1999.

70. Campbell, B.A., Horsman, D.E., Maguire, J., Young, S., Curman, D., Ma, R., Thiessen, B. Chromosomal alterations in oligodendroglial tumours over multiple surgeries: is tumour progression associated with change in 1p/19q status? J Neurooncol. 89:37-45, 2008.

71. Cankovic, M., Mikkelsen, T., Rosenblum, M.L., Zarbo, R.J. A simplified laboratory validated assay for MGMT promoter hypermethylation analysis of glioma specimens from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Lab. Invest. 87:392-397, 2007.

72. Cao, V.T., Jung, T.Y., Jung, S., Jin, S.G., Moon, K.S., Kim, I.Y., Kang, S.S., Park, C.S., Lee, K.H., Chae, H.J. The correlation y prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas. Neurosurgery 65:866-875, 2009.

73. Cao, Y., Sundgren, P.C., Tsien, C.I., Chenevert, T.T., Junck, L. Physiologic and metabolic magnetic resonance imaging in gliomas. J. Clin. Oncol. 24:1228-1235, 2006.

74. Capelle, L., Oei, P., Teoh, H., Hamilton, D., Palmer, D., Low, I., Campbell, G. Retrospective review of prognostic factors, including 1p19q deletion, in low-grade oligodendrogliomas and a review of recent published works. J Med. Imaging Radiat. Oncol. 53:305-309, 2009.

75. Capper, D., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Schittenhelm, J. Pitfalls in the assessment of MGMT expression and its correlation with survival in diffuse astrocytomas: proposal of feasible immunohistochemical approach. Acta Neuropathol. 115:249-259, 2008.

76. Cavenee, W.K., Furnari, F.B., Nagane, M., Huang, H.-J.S., Newcomb, E.W., Bigner, D.D., Weller, M., Berens, M.E., Plate, K.H., Israel, M.A., Noble, M.D., Kleihues, P. Astrocytic tumors. En: Kleihues, P. and Cavenee, W.K. (Eds.) Pathology & Genetics. Tumours of the nervous system, Lyon: IARC Press, 2000, pp. 27-29.

77. Cayre, A., Penault-Llorca, F., De Latour, M., Rolhion, C., Feillel, V., Ferrière, J.P., Kwiatkowski, F., Finat-Duclos, F., Verrelle, P. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase gene expression and prognosis in breast carcinoma. Int. J Oncol. 21:1125-1131, 2002.

78. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2005, 2008. http://www.cbtrus.org

79. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2008, 2009. http://www.cbtrus.org

80. Celli, P., Nofrone, I., Palma, L., Cantore, G., Fortuna, A. Cerebral oligodendroglioma: prognostic factors and life history. Neurosurgery 35:1018-1034, 1994.

81. Chahlavi, A., Kanner, A., Peereboom, D., Staugaitis, S.M., Elson, P., Barnett, G. Impact of chromosome 1p status in response of oligodendroglioma to temozolomide: preliminary results. J Neurooncol. 61:267-273, 2003.

82. Chakravarti, A., Erkkinen, M.G., Nestler, U., Stupp, R., Mehta, M., Aldape, K., Gilbert, M.R., Black, P.M., Loeffler, J.S. Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma: a report on underlying mechanisms. Clin. Cancer Res. 12:4738-4746, 2006.

83. Chang, S.M., Lamborn, K.R., Kuhn, J.G., Yung, W.K., Gilbert, M.R., Wen, P.Y., Fine, H.A., Mehta, M.P., DeAngelis, L.M., Lieberman, F.S., Cloughesy, T.F., Robins, H.I., Abrey, L.E., Prados, M.D. Neurooncology clinical trial design for targeted therapies: lessons learned from the North American Brain Tumor Consortium. Neuro. Oncol. 10:631-642, 2008.

84. Chang, S.M., Parney, I.F., Huang, W., Yerson, F.A., Asher, A.L., Bernstein, M., Lillehei, K.O., Brem, H., Berger, M.S., Laws, E.R. Ptterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. JAMA 293:557-564, 2005.

85. Chang, H.J., Yoo, B.C., Kim, S.W., Lee, B.L., Kim, W.H. Significance of PML and p53 protein as molecular prognostic markers of gallbladder carcinomas. Pathol. Oncol. Res. 13:326-335, 2007.

86. Chen, S.P., Chiu, S.C., Wu, C.C., Lin, S.Z., Kang, J.C., Chen, Y.L., Lin, P.C., Pang, C.Y., Harn, H.J. The association of methylation in the promoter of APC and MGMT and the prognosis of Taiwanese CRC patients. Genet. Test. Mol Biomarkers 13:67-71, 2009.

87. Chen, Z.P., Malapetsa, A., McQuillan, A., Marcantonio, D., Bello, V., Mohr, G., Remack, J., Brent, T.P., Panasci, L.C. Evidence for nucleotide excision repair as a modifying factor of

O6-Methylguanine-DNA methyltransefarse-mediated innate chloroethylnitrosourea resistance in human tumor cell lines. Mol. Pharmacol. 52:815-820, 1997.

88. Chen, Z.P., Yarosh, D., Garcia, Y., Tampieri, D., Mohr, G., Malapetsa, A., Langleben, A., Panasci, L.C. Relationship between O6-methylguanine DNA methyltransferase levels and clinical response induced by chloroethylnitrosourea therapy in glioma patients. Can. J. Neurol. Sci. 26:104-109, 1999.

89. Chen, J.M., Zhang, Y.P., Wang, C., Sun, Y., Fujimoto, J., Ikenaga, M. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase activity in human tumors. Carcinogenesis 13:1503-1507, 1992.

90. Chim, C.S., Wong, S.Y., Kwong, Y.L. Aberrant gene promoter methylation in acute promyelocytic leukaemia: profile and prognostic significance. Br. J Haematol. 122:571-578, 2003.

91. Chinot, O.L., Barrie, M., Fuentes, S., Eudes, N., Lancelot, S., Metellus, P., Muracciole, X., Braguer, D., Ouafik, L., Martin, P.M., Dufour, H., Figarella-Branger, D. Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. J Clin. Oncol. 25:1470-1475, 2007.

92. Choi, K.Y., Jung, T.Y., Jung, S., Kim, Y.H., Moon, K.S., Kim, I.Y., Kang, S.S., Lee, K.H. Prognosis of oligodendroglial tumor with ring enhancement showing central necrotic portion. J Neurooncol., Aug 25. [Epub ahead of print], DOI 10.1007/s11060-010-0353-z, 2010.

93. Choy, K.W., Pang, C.P., To, K.F., Yu, C., Ng, J.S.K., Lam, D.S.C. Impaired expression and promotor hypermethylation of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase in retinoblastoma tissues. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (PA) 43:1344-1349, 2002.

94. Christmann, M., Pick, M., Lage, H., Schadendorf, D., Kaina, B. Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. Int. J Cancer 92:123-129, 2001.

95. Chu, L.C., Eberhart, C.G., Grossman, S.A., Herman, J.G. Epigenetic silencing of multiple genes in primary CNS lymphoma. Int. J Cancer 119:2487-2491, 2006.

96. Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L., Frommer, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. Nucleic Acids Res. 22:2990-2997, 1994.

97. Clarke, J.L., Iwamoto, F.M., Sul, J., Panageas, K., Lassman, A.B., DeAngelis, L.M., Hormigo, A., Nolan, C.P., Gavrilovic, I., Karimi, S., Abrey, L.E. Ryomized phase II trial of chemoradiotherapy followed by either dose-dense or metronomic temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. J Clin. Oncol. 27:3861-3867, 2009.

98. Clark, S.J., Melki, J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? Oncogene 21:5380-5387, 2002.

99. Collins, V.P., James, C.D. Gene and chromosomal alterations associated with the development of human gliomas. FASEB J. 7:926-930, 1993.

100. Compostella, A., Tosoni, A., Blatt, V., Franceschi, E., Bryes, A.A. Prognostic factors for anaplastic astrocytomas. J. Neurooncol. 81:295-303, 2007.

101. Coons, S.W., Johnson, P.C., Pearl, D.K. The prognostic significance of Ki-67 labeling indices for oligodendrogliomas. Neurosurgery 41:878-884, 1997.

102. Coons, S.W., Johnson, P.C., Scheithauer, B.W., Yates, A.J., Pearl, D.K. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. Cancer 79:1381-1393, 1997.

103. Cooper, W.A., Kohonen-Corish, M.R., Chan, C., Kwun, S.Y., McCaughan, B., Kennedy, C., Sutherly, R.L., Lee, C.S. Prognostic significance of DNA repair proteins MLH1, MSH2 and MGMT expression in non-small-cell lung cancer and precursor lesions. Histopathology 52:613-622, 2008.

104. Costello, J.F., Futscher, B.W., Kroes, R.A., Pieper, R.O. Methylation-Related crhomatin structure is associated with exclusion of transcription factors from and suppressed

expression of the O6-Methylguanine-DNA methyltransferase gene in human glioma cell lines. Mol. Cell. Biol. 14:6515-6521, 1994.

105. Costello, J.F., Futscher, B.W., Tano, K., Graunke, D.M., Pieper, R.O. 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. 269:17228-17237, 1994.

106. Crinière, E., Kaloshi, G., Laigle-Donadey, F., Lejeune, J., Auger, N., Benouaich-Amiel, A., Everhard, S., Mokhtari, K., Polivka, M., Delattre, J.Y., Hoang-Xuan, K., Thillet, J., Sanson, M. MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities. J. Neurooncol. 83:173-179, 2007.

107. Curran, W.J.Jr., Scott, C.B., Horton, J., Nelson, J.S., Weinstein, A.S., Fischbach, A.J., Chang, C.H., Rotman, M., Asbell, S.O., Krisch, R.E., Nelson, D.F. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three radiation therapy oncology group malignant glioma trials. J. Natl. Cancer Inst. 85:704-710, 1993.

108. Danam, R.P., Howell, S.R., Brent, T.P., Harris, L.C. Epigenetic regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. Mol Cancer Ther. 4:61-69, 2005.

109. Danam, R.P., Qian, X.C., Howell, S.R., Brent, T.P. Methylation of selected Cpgs in the human O6-Methylguanine-DNA metyltransferase promoter region as a marker of gene silencing. Mol. Carcinog. 24:85-89, 1999.

110. Das, P.M., Singal, R. DNA Methylation and cancer. J. Clin. Oncol. 22:4632-4642, 2004.

111. Daumas-Duport, C., Varlet, P., Tucker, M.-L., Beuvon, F., Cervera, P., Chodkiewicz, J.P. Oligodendrogliomas: Part 1-Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: A study of 153 cases. J. Neurooncol. 34:37-59, 1997.

112. Davidoff, F., Haynes, B., Sackett, D., Smith, R. Evidence based medicine. BMJ 310:1085-1086, 1995.

113. De, S.H., Geeraerts, H., Verbeken, E., Nuyts, S. Promoter methylation of TIMP3 and CDH1 predicts better outcome in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy only. Oncol. Rep. 21:507-513, 2009.

114. DeAngelis, L.M. Brain tumors. N. Engl. J. Med. 344:114-123, 2001.

115. DeAngelis, L.M. Anaplastic glioma: how to prognosticate outcome and choose a treatment strategy. J Clin. Oncol. 27:5861-5862, 2009.

116. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica en personas 2010.

117. Deeks, J.J. Systematic reviews in health care: Systematic reviews of evaluations of diagnostic and screening tests. BMJ 323:157-162, 2001.

118. Deeks, J.J., Macaskill, P., Irwig, L. The performance of tests of publication bias and other sample size effects in systematic reviews of diagnostic test accuracy was assessed. J Clin. Epidemiol. 58:882-893, 2005.

119. Dehais, C., Laigle-Donadey, F., Marie, Y., Kujas, M., Lejeune, J., Benouaich-Amiel, A., Pedretti, M., Polivka, M., Xuan, K.H., Thillet, J., Delattre, J.Y., Sanson, M. Prognostic stratification of patients with anaplastic gliomas according to genetic profile. Cancer 107:1891-1897, 2006.

120. Deng, G., Kakar, S., Tanaka, H., Matsuzaki, K., Miura, S., Sleisenger, M.H., Kim, Y.S. Proximal and distal colorectal cancers show distinct gene-specific methylation profiles and clinical and molecular characteristics. Eur. J Cancer 44:1290-1301, 2008.

121. DerSimonian, R., Laird, N. Meta-analysis in clinical trials. Control Clin. Trials 7:177-188, 1986.

122. Deville, W.L., Buntinx, F., Bouter, L.M., Montori, V.M., de Vet, H.C., van der Windt, D.A., Bezemer, P.D. Conducting systematic reviews of diagnostic studies: didactic guidelines. BMC. Med. Res. Methodol. 2:9, 2002.

123. Dikshit, R.P., Gillio-Tos, A., Brennan, P., De, M.L., Fiano, V., Martinez-Penuela, J.M., Boffetta, P., Merletti, F. Hypermethylation, risk factors, clinical characteristics, and survival in 235 patients with laryngeal and hypopharyngeal cancers. Cancer 110:1745-1751, 2007.

124. Donahue, B., Scott, C.B., Nelson, J.S., Rotman, M., Murray, K.J., Nelson, D.F., Banker, F.L., Earle, J.D., Fischbach, J.A., Asbell, S.O., Gaspar, L.E., Markoe, A.M., Curran, W. Influence of an oligodendroglial component on the survival of patients with anaplastic astrocytomas: a report of radiation therapy oncology group 83-02. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 38:911-914, 1997.

125. Dong, Z., Pang, J.S., Ng, M.H., Poon, W.S., Zhou, L., Ng, H.K. Identification of two contiguous minimally deleted regions on chromosome 1p36.31-p36.32 in oligodendroglial tumours. Br. J Cancer 91:1105-1111, 2004.

126. Dong, Z.Q., Pang, J.C., Tong, C.Y., Zhou, L.F., Ng, H.K. Clonality of oligoastrocytomas. Hum. Pathol. 33:528-535, 2002.

127. Duffau, H. Lessons from brain mapping in surgery for low-grade glioma: insights into associations between tumour and brain plasticity. Lancet Neurol. 4:476-486, 2005.

128. Duffau, H., Denvil, D., Capelle, L. Long term reshaping of langage, sensory, and motor maps after glioma resection: a new parameter to integrate in the surgical strategy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 72:511-516, 2002.

129. Duffy, M.J., Napieralski, R., Martens, J.W., Span, P.N., Spyratos, F., Sweep, F.C., Brunner, N., Foekens, J.A., Schmitt, M. Methylated genes as new cancer biomarkers. Eur. J Cancer 45:335-346, 2009.

130. Dunn, J., Baborie, A., Alam, F., Joyce, K., Moxham, M., Sibson, R., Crooks, D., Husby, D., Shenoy, A., Brodbelt, A., Wong, H., Liloglou, T., Haylock, B., Walker, C. Extent of

MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. Br. J Cancer 101:124-131, 2009.

131. Easterbrook, P., Berlin, J. Meta-analysis. Lancet 341:965, 1993.

132. Easterbrook, P.J., Berlin, J.A., Gopalan, R., Matthews, D.R. Publication bias in clinical research. Lancet 337:867-872, 1991.

133. Egger, M., Smith, G.D., Schneider, M., Minder, C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. BMJ 315:629-634, 1997.

134. Egger, M., Zellweger-Zahner, T., Schneider, M., Junker, C., Lengeler, C., Antes, G. Language bias in ryomised controlled trials published in English and German. Lancet 350:326-329, 1997.

135. El-Hateer, H., Souhami, L., Roberge, D., Maestro, R.D., Leblanc, R., Eldebawy, E., Muanza, T., Melancon, D., Kavan, P., Guiot, M.C. Low-grade oligodendroglioma: an indolent but incurable disease? Clinical article. J Neurosurg 111:265-271, 2009.

136. Engelhard, H.H., Stelea, A., Cochran, E.J. Oligodendroglioma: pathology and molecular biology. Surg. Neurol. 58:111-117, 2002.

137. Eoli, M., Bissola, L., Bruzzone, M.G., Pollo, B., Maccagnano, C., De, S.T., Valletta, L., Silvani, A., Bianchessi, D., Broggi, G., Boiardi, A., Finocchiaro, G. Reclassification of oligoastrocytomas by loss of heterozygosity studies. Int. J Cancer 119:84-90, 2006.

138. Eoli, M., Menghi, F., Bruzzone, M.G., De, S.T., Valletta, L., Pollo, B., Bissola, L., Silvani, A., Bianchessi, D., D'Incerti, L., Filippini, G., Broggi, G., Boiardi, A., Finocchiaro, G. Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. Clin. Cancer Res. 13:2606-2613, 2007.

139. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. Oncogene 21:5427-5440, 2002.

140. Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., Herman, J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. Cancer Res. 61:3225-3229, 2001.

141. Esteller, M., Gaidano, G., Goodman, S.N., Zagonel, V., Capello, D., Botto, B., Rossi, D., Gloghini, A., Vitolo, U., Carbone, A., Baylin, S.B., Herman, J.G. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. J Natl. Cancer Inst. 94:26-32, 2002.

142. Esteller, M., García-Foncillas, J., Yion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., Herman, J.G. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. N. Eng J. Med. 343:1350-1354, 2000.

143. Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B., Herman, J.G. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. Cancer Res. 59:793-797, 1999.

144. Esteller, M., Herman, J.G. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-Methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. Oncogene 23:1-8, 2004.

145. Everhard, S., Kaloshi, G., Crinière, E., Benouaich-Amiel, A., Lejeune, J., Marie, Y., Sanson, M., Kujas, M., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.Y., Thillet, J. MGMT Methylation: a marker of response to Temozolamide in low-grade gliomas. Ann. Neurol. 60:740-743, 2006.

146. Everhard, S., Tost, J., El, A.H., Criniere, E., Busato, F., Marie, Y., Gut, I.G., Sanson, M., Mokhtari, K., Laigle-Donadey, F., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.Y., Thillet, J. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. Neuro. Oncol. 11:348-356, 2009.

147. Fabi, A., Metro, G., Russillo, M., Vidiri, A., Carapella, C.M., Maschio, M., Cognetti, F., Jyolo, B., Mirri, M.A., Sperduti, I., Telera, S., Carosi, M., Pace, A. Treatment of recurrent malignant gliomas with fotemustine monotherapy: impact of dose and correlation with MGMT promoter methylation. BMC Cancer 9:101, 2009.

148. Felsberg, J., Erkwoh, A., Sabel, M.C., Kirsch, L., Fimmers, R., Blaschke, B., Schlegel, U., Schramm, J., Wiestler, O.D., Reifenberger, G. Oligodendroglial tumors: refinement of cyidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. Brain Pathol. 14:121-130, 2004.

149. Felsberg, J., Rapp, M., Loeser, S., Fimmers, R., Stummer, W., Goeppert, M., Steiger, H.J., Friedensdorf, B., Reifenberger, G., Sabel, M.C. Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. Clin. Cancer Res. 15:6683-6693, 2009.

150. Felson, D.T. Bias in meta-analytic research. J Clin. Epidemiol. 45:885-892, 1992.

151. Ferrer-Luna, R., Mata, M., Nunez, L., Calvar, J., Dasi, F., Arias, E., Piquer, J., Cerda-Nicolas, M., Taratuto, A.L., Sevlever, G., Celda, B., Martinetto, H. Loss of heterozygosity at 1p-19q induces a global change in oligodendroglial tumor gene expression. J Neurooncol. 95:343-354, 2009.

152. Fischbach, A.J., Martz, K.L., Nelson, J.S., Griffin, T.W., Chang, C.H., Horton, J., Nelson, D.F. Long-term survival in treated anaplastic astrocytomas. A report of combined RTOG/ECOG studies. Am. J. Clin. Oncol. 14:365-370, 1991.

153. Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHugh, P.R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr. Res. 12:189-198, 1975.

154. Fortin, D., Cairncross, G.J., Hammond, R.R. Oligodendroglioma: an appraisal of recent data pertaining to diagnosis and treatment. Neurosurgery 45:1279-1291, 1999.

155. Fortin, D., Macdonald, D.R., Stitt, L., Cairncross, J.G. PCV for oligodendroglial tumors: in search of prognostic factors for response and survival. Can. J Neurol. Sci. 28:215-223, 2001.

156. Fox, E.J., Leahy, D.T., Geraghty, R., Mulcahy, H.E., Fennelly, D., Hyly, J.M., O'Donoghue, D.P., Sheahan, K. Mutually exclusive promoter hypermethylation patterns of

hMLH1 and O6-methylguanine DNA methyltransferase in colorectal cancer. J Mol Diagn 8:68-75, 2006.

157. Fraga, M.F., Esteller, M. DNA Methylation: a profile of methods and applications. Biotechniques 33:632-649, 2002.

158. Friedman, H.S., Kokkinakis, D.M., Pluda, J., Friedman, A.H., Cokgor, I., Haglund, M.M., Ashley, D.M., Rich, J., Dolan, M.E., Pegg, A.E., Moschel, R.C., McLendon, R.E., Kerby, T., Herndon, J.E., Bigner, D.D., Schold, S.C. Phase I trial of O6-benzylguanine for patients undergoing surgery for malignant glioma. J. Clin. Oncol. 16:3570-3575, 1999.

159. Friedman, H.S., McLendon, R.E., Kerby, T., Dugan, M., Bigner, S.H., Henry, A.J., Ashley, D.M., Krischer, J., Lovell, S., Rasheed, K., Marchev, F., Seman, A.J., Cokgor, I., Rich, J., Stewart, E., Colvin, O.M., Provenzale, J.M., Bigner, D.D., Haglund, M.M., Friedman, A.H., Modrich, P.L. DNA Mismatch repair and O6-alkyguanine-DNA alkyltransferase analysis y response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. J. Clin. Oncol. 16:3851-3857, 1998.

160. Fritz, G., Tano, K., Mitra, S., Kaina, B. Inducibility of the DNA repair gene encoding O6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. Mol Cell Biol. 11:4660-4668, 1991.

161. Fueyo, J., Gómez-Manzano, C. Control molecular del ciclo celular y la apoptosis: nuevos tratamientos para los gliomas. Neurologia 13:349-355, 1998.

162. Fueyo, J., Gómez-Manzano, G., Yung, W.K.A., Kyritsis, A.P. The functional role of tumor suppressor genes in gliomas. Clues for future therapeutic strategies. Neurology 51:1250-1255, 1998.

163. Furonaka, O., Takeshima, Y., Awaya, H., Kushitani, K., Kohno, N., Inai, K. Aberrant methylation and loss of expression of O-methylguanine-DNA methyltransferase in pulmonary squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Pathol. Int. 55:303-309, 2005.

164. Gadji, M., Fortin, D., Tsanaclis, A.M., Drouin, R. Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas? Cancer Genet. Cytogenet. 194:12-22, 2009.

165. Garcia, P., Manterola, C., Araya, J.C., Villaseca, M., Guzman, P., Sanhueza, A., Thomas, M., Alvarez, H., Roa, J.C. Promoter methylation profile in preneoplastic and neoplastic gallbladder lesions. Mol Carcinog. 48:79-89, 2009.

166. Gerson, S.L. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. J. Clin. Oncol. 20:2388-2399, 2002.

167. Gerson, S.L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. Nat. Rev. Cancer 4:296-307, 2004.

168. George, S.L. Statistical issues in translational cancer research. Clin. Cancer Res. 14:5954-5958, 2008.

169. Ginsberg, L.E., Fuller, G.N., Hashmi, M., Leeds, N.E., Schomer, D.F. The significance of lack of MR contrast enhancement of supratentorial brain tumors in adults: histopathological evaluation of a series. Surg Neurol 49:436-440, 1998.

170. Glantz, M.J., Cole, B.F., Forsyth, P.A., Recht, L.D., Wen, P.Y., Chamberlain, M.C., Grossman, S.A., Cairncross, J.G. Practice parameter: anticonvulsant prophylaxis in patients with newly diagnosed brain tumors. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology 54:1886-1893, 2000.

171. Glas, A.S., Lijmer, J.G., Prins, M.H., Bonsel, G.J., Bossuyt, P.M. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. J Clin. Epidemiol. 56:1129-1135, 2003.

172. Gorlia, T., van den Bent, M.J., Hegi, M.E., Mirimanoff, R.O., Weller, M., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Belanger, K., Bryes, A.A., Allgeier, A., Lacombe, D., Stupp, R. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. Lancet Oncol. 9:29-38, 2008.

173. Goze, C., Rigau, V., Gibert, L., Maudelonde, T., Duffau, H. Lack of complete 1p19q deletion in a consecutive series of 12 WHO grade II gliomas involving the insula: a marker of worse prognosis? J Neurooncol. 91:1-5, 2009.

174. Grasbon-Frodl, E.M., Kreth, F.W., Ruiter, M., Schnell, O., Bise, K., Felsberg, J., Reifenberg, G., Tonn, J.C., Kretzschmar, H.A. Intratumoral homogeinity of MGMT promoter hypermetilation as demosnstrated in serial stereotactic specimens for anaplastic astrocytomas and glioblastomas. Int. J. Cancer 121:2458-2464, 2007.

175. Gregoire, G., Derderian, F., Le, L.J. Selecting the language of the publications included in a meta-analysis: is there a Tower of Babel bias? J Clin. Epidemiol. 48:159-163, 1995.

176. Griffin, C.A., Burger, P., Morsberger, L., Yonescu, R., Swierczynski, S., Weingart, J.D., Murphy, K.M. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. J Neuropathol. Exp. Neurol. 65:988-994, 2006.

177. Grombacher, T., Mitra, S., Kaina, B. Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. Carcinogenesis 17:2329-2336, 1996.

178. Gross, C.G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. Nat. Rev. Neurosci. 1:67-73, 2000.

179. Guo, P., Imanishi, Y., Cackowski, F.C., Jarzynka, M.J., Tao, H.Q., Nishikawa, R., Hirose, T., Hu, B., Cheng, S.Y. Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloprotease-2, membrane type 1 metalloprotease, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma. Am. J Pathol. 166:877-890, 2005.

180. Hainfellner, J.A., Heinzl, H. Neuropathological biomarker cyidates in brain tumors: key issues for translational efficiency. Clin. Neuropathol. 29:41-54, 2010.

181. Hales, R.K., Shokek, O., Burger, P.C., Paynter, N.P., Chaichana, K.L., Quinones-Hinojosa, A., Jallo, G.I., Cohen, K.J., Song, D.Y., Carson, B.S., Wharam, M.D. Prognostic

factors in pediatric high-grade astrocytoma: the importance of accurate pathologic diagnosis. J Neurooncol. 99:65-71, 2010.

182. Halford, S., Rowan, A., Sawyer, E., Talbot, I., Tomlinson, I. O6-methylguanine methyltransferase in colorectal cancers: detection of mutations, loss of expression, and weak association with G:C>A:T transitions. Gut 54:797-802, 2005.

183. Halligan, S. Systematic reviews and meta-analysis of diagnostic tests. Clin. Radiol. 60:977-979, 2005.

184. Hamlat, A., Saikali, S., Chaperon, J., Carsin-Nicol, B., Calve, M.L., Lesimple, T., Ben-hassel, M., Guegan, Y. Proposal of a scoring scale as a survival predictor in intracranial oligodendrogliomas. J Neurooncol. 79:159-168, 2006.

185. Harada, K., Nishizaki, T., Ozaki, S., Kubota, H., Ito, H., Sasaki, K. Intratumoral cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry in human gliomas. Cancer Res. 58:4694-4700, 1998.

186. Harris, L.C., Remack, J.S., Houghton, P.J., Brent, T.P. Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. Cancer Res. 56:2029-2032, 1996.

187. Hashimoto, N., Murakami, M., Takahashi, Y., Fujimoto, M., Inazawa, J., Mineura, K. Correlation between genetic alteration and long-term clinical outcome of patients with oligodendroglial tumors, with identification of a consistent region of deletion on chromosome arm 1p. Cancer 97:2254-2261, 2003.

188. Hayashi, H., Yazawa, T., Okudela, K., Nagai, J., Ito, T., Kanisawa, M., Kitamura, H. Inactivation of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase in human lung adenocarcinoma relates to high-grade histology and worse prognosis among smokers. Jpn. J. Cancer Res. 93:184-189, 2002.

189. Hegi, M.E., Diserens, A.C., Godard, S., Dietrich, P.Y., Regli, L., Ostermann, S., Otten, P., Van Melle, G., de Tribolet, N., Strupp, R. Clinical trial substantiates the predictive value of

O6 Metylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with Temozolamide. Clin. Cancer Res. 10:1871-1874, 2004.

190. Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E.C., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Stupp, R. MGMT gene silencing and benefit from Temozolamide in glioblastoma. N. Engl. J. Med. 352:997-1003, 2005.

191. Hegi, M.E., Liu, L., Herman, J.G., Stupp, R., Wick, W., Weller, M., Mehta, M.P., Gilbert, M.R. Correlation of O6-Methylguanine Methyiltransefrase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical. J. Clin. Oncol. 26:4189-4199, 2008.

192. Heighway, J., Margison, G.P., Santibáñez Korel, M.F. The alleles of the DNA repair gene O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase are expressed at different levels in normal human lung tissue. Carcinogenesis 24:1691-1694, 2008.

193. Hengstler, J.G., Tanner, B., Moller, L., Meinert, R., Kaina, B. Activity of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in relation to p53 status and therapeutic response in ovarian cancer. Int. J Cancer 84:388-395, 1999.

194. Herath, N.I., Walsh, M.D., Kew, M., Smith, J.L., Jass, J.R., Young, J., Leggett, B.A., Macdonald, G.A. Silencing of O6-methylguanine DNA methyltransferase in the absence of promoter hypermethylation in hepatocellular carcinomas from Australia and South Africa. Oncol. Rep. 17:817-822, 2007.

195. Herfarth, K.K., Brent, T.P., Danam, R.P., Remack, J.S., Kodner, I.J., Wells, S.A., Jr., Goodfellow, P.J. A specific CpG methylation pattern of the MGMT promoter region associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers. Mol. Carcinog. 24:90-98, 1999.

196. Herman, J.G., Baylin, S.B. Gene silencing in cancer is association with promoter hypermethylation. N. Engl. J. Med. 349:2042-2054, 2003.

197. Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D., Baylin, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islys. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:9821-9826, 1996.

198. Hermisson, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Ross, W., Kaina, B., Weller, M. O6-methylguanine DNA methyltransefrase and p53 status predict temozolamide sensitivity in human malignant glioma cells. J. Neurochem. 96:766-776, 2006.

199. Higgins, J.P., Thompson, S.G., Deeks, J.J., Altman, D.G. Measuring inconsistency in meta-analyses. BMJ 327:557-560, 2003.

200. Hinestrosa, M.C., Dickersin, K., Klein, P., Mayer, M., Noss, K., Slamon, D., Sledge, G., Visco, F.M. Shaping the future of biomarker research in breast cancer to ensure clinical relevance. Nat. Rev. Cancer 7:309-315, 2007.

201. Hiraga, J., Kinoshita, T., Ohno, T., Mori, N., Ohashi, H., Fukami, S., Noda, A., Ichikawa, A., Naoe, T. Promoter hypermethylation of the DNA-repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase and p53 mutation in diffuse large B-cell lymphoma. Int. J Hematol. 84:248-255, 2006.

202. Hoang-Xuan, K., Capelle, L., Kujas, M., Taillibert, S., Duffau, H., Lejeune, J., Polivka, M., Crinière, E., Marie, Y., Mokhtari, K., Carpentier, A.F., Laigle, F., Simon, J.M., Cornu, P., Broët, P., Sanson, M. Temozolamide as initial treatment for adults with low-grade oligodendrogliomas or oligostrocytomas and correlation with chromosome 1p deletions. J. Clin. Oncol. 22:3133-3138, 2004.

203. Hoang-Xuan, K., Huguet, S., Mokhtari, K., Marie, Y., Kujas, M., Leuraud, P., Capelle, L., Delattre, J.Y., Poirier, J., Broët, P., Sanson, M. Molecular heterogeneity of oligodendrogliomas suggests alternative pathways in tumor progression. Neurology 57:1278-1281, 2001.

204. Hoelzinger, D.B., Mariani, L., Weis, J., Woyke, T., Berens, T.J., McDonough, W.S., Sloan, A., Coons, S.W., Berens, M.E. Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. Neoplasia. 7:7-16, 2005.

205. Hoffmann, A.C., Kaifi, J.T., Vallbohmer, D., Yekebas, E., Grimminger, P., Leers, J.M., Izbicki, J.R., Holscher, A.H., Schneider, P.M., Metzger, R., Brabender, J. Lack of prognostic significance of serum DNA methylation of DAPK, MGMT, and GSTPI in patients with non-small cell lung cancer. J Surg. Oncol. 100:414-417, 2009.

206. Hongeng, S., Brent, T.P., Sanford, R.A., Li, H., Kun, L.E., Heideman, R.L. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase protein levels in pediatric brain tumors. Clin. Cancer Res. 3:2459-2463, 1997.

207. House, M.G., Herman, J.G., Guo, M.Z., Hooker, C.M., Schulick, R.D., Lillemoe, K.D., Cameron, J.L., Hruban, R.H., Maitra, A., Yeo, C.J. Aberrant hypermethylation of tumor suppressor genes in pancreatic endocrine neoplasms. Ann. Surg. 238:423-431, 2003.

208. Houten, J.K., Cooper, P.R. Spinal cord astrocytomas: presentation, management and outcome. J. Neurooncol. 47:219-224, 2000.

209. Huang, L., Jiang, T., Yuan, F., Li, G.L., Cui, Y., Liu, E.Z., Wang, Z.C. Correlation of chromosomes 1p and 19q status and expressions of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), p53 and Ki-67 in diffuse gliomas of World Health Organization (WHO) grades II and III: a clinicopathological study. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 35:367-379, 2009.

210. Huang, L., Jiang, T., Yuan, F., Li, G.L., Liu, E.Z., Wang, Z.C. Correlations between molecular profile and tumor location in Chinese patients with oligodendroglial tumors. Clin. Neurol. Neurosurg. 110:1020-1024, 2008.

211. Husemann, K., Wolter, M., Buschges, R., Bostrom, J., Sabel, M., Reifenberger, G. Identification of two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 and rare mutation of the CDKN2C gene from 1p32 in oligodendroglial tumors. J Neuropathol. Exp. Neurol. 58:1041-1050, 1999.

212. Iafrate, A.J., Louis, D.N. "MGMT for pt mgmt": is Methylguanine-DNA Methyltransferase testing ready for patient management? J Mol Diagn 10:308-310, 2008.

213. Ichimura, K., Mungall, A.J., Fiegler, H., Pearson, D.M., Dunham, I., Carter, N.P., Collins, V.P. Small regions of overlapping deletions on 6q26 in human astrocytic tumours identified using chromosome 6 tile path array-CGH. Oncogene 25:1261-1271, 2006.

214. Ichimura, K., Schmidt, E.E., Miyakawa, A., Goike, H.M., Collins, V.P. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. Genes Chromosomes. Cancer 22:9-15, 1998.

215. Idbaih, A., Kouwenhoven, M., Jeuken, J., Carpentier, C., Gorlia, T., Kros, J.M., French, P., Teepen, J.L., Delattre, O., Delattre, J.Y., van den Bent, M., Hoang-Xuan, K. Chromosome 1p loss evaluation in anaplastic oligodendrogliomas. Neuropathology 28:440-443, 2008.

216. Idbaih, A., Marie, Y., Pierron, G., Brennetot, C., Hoang-Xuan, K., Kujas, M., Mokhtari, K., Sanson, M., Lejeune, J., Aurias, A., Delattre, O., Delattre, J.Y. Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. Ann. Neurol. 58:483-487, 2005.

217. Idbaih, A., Omuro, A., Ducray, F., Hoang-Xuan, K. Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas. Curr. Opin. Oncol. 19:606-611, 2007.

218. Ingold, B., Schraml, P., Heppner, F.L., Moch, H. Homogeneous MGMT immunoreactivity correlates with an unmethylated MGMT promoter status in brain metastases of various solid tumors. PLoS. ONE. 4:e4775, 2009.

219. Ino, Y., Betensky, R., Zlatescu, M.C., Sasaki, H., Macdonald, D.R., Stemmer-Rachamimov, A.O., Ramsay, D.A., Cairncross, J.G., Louis, D.N. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. Clin. Cancer Res. 7:839-845, 2001.

220. Ino, Y., Zlatescu, M.C., Sasaki, H., Macdonald, D.R., Stemmer-Rachamimov, A.O., Jhung, S., Ramsay, D.A., von Deimling, A., Louis, D.N., Cairncross, J.G. Long survival and

therapeutic responses in patients with histologically disparate high-grade gliomas demonstrating chromosome 1p loss. J Neurosurg 92:983-990, 2000.

221. Inoue, R., Isono, M., Abe, M., Abe, T., Kobayashi, H. A genotype of the polymorphic DNA repair gene MGMT is associated with de novo glioblastoma. Neurol. Res. 25:875-879, 2003.

222. Irwig, L., Macaskill, P., Glasziou, P., Fahey, M. Meta-analytic methods for diagnostic test accuracy. J Clin. Epidemiol. 48:119-130, 1995.

223. Irwig, L., Tosteson, A.N., Gatsonis, C., Lau, J., Colditz, G., Chalmers, T.C., Mosteller, F. Guidelines for meta-analyses evaluating diagnostic tests. Ann. Intern. Med. 120:667-676, 1994.

224. Ishii, D., Natsume, A., Wakabayashi, T., Hatano, H., Asano, Y., Takeuchi, H., Shimato, S., Ito, M., Fujii, M., Yoshida, J. Efficacy of temozolomide is correlated with 1p loss and methylation of the deoxyribonucleic acid repair gene MGMT in malignant gliomas. Neurol. Med. Chir (Tokyo) 47:341-349, 2007.

225. Issa, J.-P.J. Methylation and prognosis: of molecular clocks and hypermethylator phemotypes (editorial) Clin. Cancer Res. 9:2879-2881, 2003.

226. Issa, J.-P. CpG isly methylator phenotype in cancer. Nature Reviews 4:988-993, 2004.

227. Jacinto, F.V., Esteller, M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. DNA Repair (Amst) 6:1155-1160, 2007.

228. Jackson, R.J., Fuller, G.N., Abi-Said, D., Lang, F.F., Gokaslan, Z.L., Shi, W.M., Wildrick, D.M., Sawaya, R. Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas. Neuro-Oncology 3:193-200, 2001.

229. Jacobs, K.M., Donoghue, J.P. Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. Science 251:944-947, 1991.

230. Jaeckle, K.A., Ballman, K.V., Rao, R.D., Jenkins, R.B., Buckner, J.C. Current strategies in treatment of oligodendroglioma: evolution of molecular signatures of response. J Clin. Oncol. 24:1246-1252, 2006.

231. Jaeckle, K.A., Eyre, H.J., Townsend, J.J., Schulman, S., Knudson, H.M., Belanich, M., Yarosh, D.B., Bearman, S.I., Giroux, D.J., Schold, S.C. Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. J. Clin. Oncol. 16:3310-3315, 1998.

232. Jarvela, S., Helin, H., Haapasalo, J., Jarvela, T., Junttila, T.T., Elenius, K., Tanner, M., Haapasalo, H., Isola, J. Amplification of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours by chromogenic in situ hybridization: association with clinicopathological features and patient survival. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 32:441-450, 2006.

233. Jenkinson, M.D., du Plessis, D.G., Smith, T.S., Joyce, K.A., Warnke, P.C., Walker, C. Histological growth patterns and genotype in oligodendroglial tumours: correlation with MRI features. Brain 129:1884-1891, 2006.

234. Jenkinson, M.D., Smith, T.S., Joyce, K., Fildes, D., du Plessis, D.G., Warnke, P.C., Walker, C. MRS of oligodendroglial tumors: correlation with histopathology and genetic subtypes. Neurology 64:2085-2089, 2005.

235. Jesien-Lewyowicz, E., Jesionek-Kupnicka, D., Zawlik, I., Szybka, M., Kulczycka-Wojdala, D., Rieske, P., Sieruta, M., Jaskolski, D., Och, W., Skowronski, W., Sikorska, B., Potemski, P., Papierz, W., Liberski, P.P., Kordek, R. High incidence of MGMT promoter methylation in primary glioblastomas without correlation with TP53 gene mutations. Cancer Genet. Cytogenet. 188:77-82, 2009.

236. Jeuken, J.W., Cornelissen, S.J., Vriezen, M., Dekkers, M.M., Errami, A., Sijben, A., Boots-Sprenger, S.H., Wesseling, P. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. Lab Invest 87:1055-1065, 2007.

237. Jeuken, J.W., Sprenger, S.H., Boerman, R.H., von, D.A., Teepen, H.L., van Overbeeke, J.J., Wesseling, P. Subtyping of oligo-astrocytic tumours by comparative genomic hybridization. J Pathol. 194:81-87, 2001.

238. Ji, W., Yang, L., Yu, L., Yuan, J., Hu, D., Zhang, W., Yang, J., Pang, Y., Li, W., Lu, J., Fu, J., Chen, J., Lin, Z., Chen, W., Zhuang, Z. Epigenetic silencing of O6-methylguanine DNA methyltransferase gene in NiS-transformed cells. Carcinogenesis 29:1267-1275, 2008.

239. Jo, H., Kang, S., Kim, J.W., Kang, G.H., Park, N.H., Song, Y.S., Park, S.Y., Kang, S.B., Lee, H.P. Hypermethylation of the COX-2 gene is a potential prognostic marker for cervical cancer. J Obstet. Gynaecol. Res. 33:236-241, 2007.

240. Jones, P.A. The DNA methylation paradox. Trends Genet. 15:34-37, 1999.

241. Jones, P.A. DNA methylation and cancer. Oncogene 21:5358-5360, 2002.

242. Jones, P.A., Laird, P.W. Cancer epigenetics comes from age. Nat. Genet. 21:163-167, 1999.

243. Jones, P.A., Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science 293:1068-1070, 2001.

244. Jullierat-Jeanneret, L., Chapuis Bernasconi, C., Bricod, C., Gros, S., Trepey, S., Benhattar, J., Janzer, R.C. Heterogeinity of human glioblastoma: glutatione-S-transferase and methylguanine-methyltransferase. Cancer Invest. 26:597-609, 2008.

245. Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., Roos, W.P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. DNA Repair (Amst) 6:1079-1099, 2007.

246. Kamiryo, T., Tada, K., Shiraishi, S., Shinojima, N., Kochi, M., Ushio, Y. Correlation between promoter hypermethylation of the O6- Methylguanine-Deoxyirbonucleic cid methyltransferase gene y prognosis in patients with high-grade astrocytic tumors treated

with surgery, radiotherapy, and 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-based chemotherapy. Neurosurgery 52:349-357, 2004.

247. Kanamori, M., Kumabe, T., Sonoda, Y., Nishino, Y., Watanabe, M., Tominaga, T. Predictive factors for overall and progression-free survival, and dissemination in oligodendroglial tumors. J Neurooncol. 93:219-228, 2009.

248. Kang, G.H., Lee, S., Lee, H.J., Hwang, K.S. Aberrant CpG isly hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. J. Pathol. 202:233-240, 2004.

249. Kapoor, G.S., Gocke, T.A., Chawla, S., Whitmore, R.G., Nabavizadeh, A., Krejza, J., Lopinto, J., Plaum, J., Maloney-Wilensky, E., Poptani, H., Melhem, E.R., Judy, K.D., O'Rourke, D.M. Magnetic resonance perfusion-weighted imaging defines angiogenic subtypes of oligodendroglioma according to 1p19q and EGFR status. J Neurooncol. 92:373-386, 2009.

250. Karayan-Tapon, L., Quillien, V., Guilhot, J., Wager, M., Fromont, G., Saikali, S., Etcheverry, A., Hamlat, A., Loussouarn, D., Campion, L., Campone, M., Vallette, F.M., Gratas-Rabbia-Re, C. Prognostic value of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. J Neurooncol. 97:311-322, 2010.

251. Karlbom, A.E., James, C.D., Boethius, J., Cavenee, W.K., Collins, V.P., Nordenskjöld, M., Larsson, C. Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. Hum. Genet. 92:169-174, 1993.

252. Karnofsky, D.A., Abelmann, W.H., Graver, L.F., Burchenal J.H.. The use of nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma. With particular reference to bronchogenic carcinoma. Cancer 1: 634-56, 1948.

253. Kawaguchi, K., Oda, Y., Saito, T., Yamamoto, H., Takahira, T., Kobayashi, C., Tamiya, S., Tateishi, N., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M. DNA hypermethylation status of multiple genes in soft tissue sarcomas. Mod. Pathol. 19:106-114, 2006.

254. Kawate, H., Itoh, R., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., Ide, F., Ishikawa, T., Noda, T., Nawata, H., Sekiguchi, M. A defect in a single allele of Mlh1 gene causes dissociation of the killing and tumorigenic actions of an alkylating carcinogen in methyltransferase-deficient mice. Carcinogenesis 21:301-305, 2000.

255. Kawate, H., Sakumi, K., Tsuzuki, T., Nakatsuru, Y., Ishikawa, T., Takahashi, S., Takano, H., Noda, T., Sekiguchi, M. Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:5116-5120, 1998.

256. Kelavkar, U.P., Harya, N.S., Hutzley, J., Bacich, D.J., Monzon, F.A., Chyran, U., Dhir, R., O'Keefe, D.S. DNA methylation paradigm shift: 15-lipoxygenase-1 upregulation in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer by atypical promoter hypermethylation. Prostaglyins Other Lipid Mediat. 82:185-197, 2007.

257. Kelly, P.J., Daumas-Duport, C., Scheithauer, B.W., Kall, B.A., Kispert, D.B. Stereotactic histologic correlations of computed tomography and magnetic resonance imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms. Mayo Clin. Proc. 62:450-459, 1987.

258. Kesari, S., Schiff, D., Drappatz, J., LaFrankie, D., Doherty, L., Macklin, E.A., Muzikansky, A., Santagata, S., Ligon, K.L., Norden, A.D., Ciampa, A., Bradshaw, J., Levy, B., Radakovic, G., Ramakrishna, N., Black, P.M., Wen, P.Y. Phase II study of protracted daily temozolomide for low-grade gliomas in adults. Clin. Cancer Res. 15:330-337, 2009.

259. Kim, S.H., Bae, S.I., Lee, H.S., Kim, W.H. Alteration of O6-methylguanie-DNA methyltransferase in colorectal neoplasms in sporadic and familial adenomatous polyposis patients. Mol. Carcinog. 37:32-38, 2003.

260. Kim, J.C., Choi, J.S., Roh, S.A., Cho, D.H., Kim, T.W., Kim, Y.S. Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas. Ann. Surg. Oncol. 17:1767-1776, 2010.

261. Kim, S.H., Kim, H., Kim, T.S. Clinical, histological, and immunohistochemical features predicting 1p/19q loss of heterozygosity in oligodendroglial tumors. Acta Neuropathol. 110:27-38, 2005.

262. Kim, Y.T., Lee, S.H., Sung, S.W., Kim, J.H. Can aberrant promoter hypermethylation of CpG islys predict the clinical outcome of non-small cell lung cancer after curative resection? Ann. Thorac. Surg. 79:1180-1188, 2005.

263. Kim, Y.T., Park, S.J., Lee, S.H., Kang, H.J., Hahn, S., Kang, C.H., Sung, S.W., Kim, J.H. Prognostic implication of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in adenocarcinoma of the lung. J Thorac. Cardiovasc. Surg. 130:1378, 2005.

264. Kim, J.W., Park, C.K., Park, S.H., Kim, Y.H., Han, J.H., Kim, C.Y., Sohn, C.H., Chang, K.H., Jung, H.W. Relationship between radiological characteristics and combined 1p and 19q deletion in World Health Organization grade III oligodendroglial tumours. J Neurol. Neurosurg Psychiatry, 2010.

265. Kim, J.I., Suh, J.T., Choi, K.U., Kang, H.J., Shin, D.H., Lee, I.S., Moon, T.Y., Kim, W.T. Inactivation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in soft tissue sarcomas: association with K-ras mutations. Hum. Pathol. 40:934-941, 2009.

266. Kimmelman, A.C., Ross, D.A., Liang, B.C. Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. Genomics 34:250-254, 1996.

267. Kitajima, Y., Miyazaki, K., Matsukura, S., Tanaka, M., Sekiguchi, M. Loss of expression of DNA repair enzymes MGMT, hMLH1, and hMSH2 during tumor progression in gastric cancer. Gastric. Cancer 6:86-95, 2003.

268. Kitange, G.J., Carlson, B.L., Mladek, A.C., Decker, P.A., Schroeder, M.A., Wu, W., Grogan, P.T., Giannini, C., Ballman, K.V., Buckner, J.C., David, J.C., Sarkaria, J.N. Evaluation of MGMT promoter methylation status and correlation with temozolomide response in orthotopic glioblastoma xenograft model. J Neurooncol. 92:23-31, 2009.

269. Kleihues, P., Burger, P.C., Rosenblum, M.K., Paulus, W., Scheithauer, B.W. Anaplastic astrocytoma. In: Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D. y Cavenee, W.K. (Eds.) WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2007, pp. 30-32.

270. Kleihues, P., Burger, P.C., Scheithauer, B.W. The new classification of brain tumors. Brain Pathol. 3:307-338, 1993.

271. Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C., Cavenee, W.K. The WHO classification of tumors of the nervous system. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 61:215-225, 2002.

272. Kleihues, P., Ohgaki, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. Neuro-Oncology 1:44-51, 1999.

273. Knudson, A.G. Two genetic hits (more or less) to cancer. Nat. Rev. Cancer 1:157-162, 2001.

274. Koeller, K.K., Rosenblum, R.S., Morrison, A.L. From the archives of the AFIP. Neoplasms of the spinal cord and filum terminale: radiologic-pathologic correlation. Radiographics 20:1721-1749, 2000.

275. Koga, Y., Kitajima, Y., Miyoshi, A., Sato, K., Kitahara, K., Soejima, H., Miyazaki, K. Tumor progression through epigenetic gene silencing of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in human biliary tract cancers. Ann. Surg. Oncol. 12:354-363, 2005.

276. Kohonen-Corish, M.R., Daniel, J.J., Chan, C., Lin, B.P., Kwun, S.Y., Dent, O.F., Dhillon, V.S., Trent, R.J., Chapuis, P.H., Bokey, E.L. Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. J Clin. Oncol. 23:2318-2324, 2005.

277. Kohya, N., Miyazaki, K., Matsukura, S., Yakushiji, H., Kitajima, Y., Kitahara, K., Fukuhara, M., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. Deficient expression of O6-Methylguanine-DNA methyltransferase combined with mismatch-repair proteins hMLH1 and hMSH2 is

related to poor prognosis in human biliary tract carcinoma. Ann. Surg. Oncol. 9:371-379, 2002.

278. Kokkinakis, D.M., Bocangel, D.B., Schold, S.C., Moschel, R.C., Pegg, A.E. Thresholds of O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase which confer significant resistance of human glial tumor xenografts to treatment with 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea or Temozolamide. Clin. Cancer Res. 7:421-428, 2001.

279. Komine, C., Watanabe, T., Katayama, Y., Yoshino, A., Yokoyama, T., Fukushima, T. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is an independent predictor of shortened progression free survival in patients with low-grade diffuse astrocytomas. Brain Pathol. 13:176-184, 2003.

280. Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R. Immunohistochemical markers for prognosis of anaplastic astrocytomas. J. Neurooncol. 58:203-215, 2002.

281. Kouwenhoven, M.C., Gorlia, T., Kros, J.M., Ibdaih, A., Bryes, A.A., Bromberg, J.E., Mokhtari, K., van Duinen, S.G., Teepen, J.L., Wesseling, P., Vyenbos, F., Grisold, W., Sipos, L., Mirimanoff, R., Vecht, C.J., Allgeier, A., Lacombe, D., van den Bent, M.J. Molecular analysis of anaplastic oligodendroglial tumors in a prospective randomized study: A report from EORTC study 26951. Neuro. Oncol. 11:737-746, 2009.

282. Kraus, J.A., Koopmann, J., Kaskel, P., Maintz, D., Bryner, S., Louis, D.N., Wiestler, O.D., von Deimling, A. Shared allelic losses of chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 54:91-95, 1995.

283. Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J.P., Heese, O., Reifenberger, G., Weller, M., Schackert, G. Long-term survival with glioblastoma multiforme. Brain 130:2596-2606, 2007.

284. Kros, J.M., Gorlia, T., Kouwenhoven, M.C., Zheng, P.P., Collins, V.P., Figarella-Branger, D., Giangaspero, F., Giannini, C., Mokhtari, K., Mørk, S.J., Paetau, A., Reifenberger, G., van den Bent, M.J. Panel review of anaplastic oligodendroglioma from European

Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 26951: Assessment of consensus in diagnosis, influence of 1p/19q loss and correlations with outcome. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 66:551, 2007.

285. Kros, J., Pieterman, H., van Eden, C., Avezaat, C.J.J. Oligodendroglioma: the Rotterdam-Dijkzigt experience. Neurosurgery 34:959-966, 1994.

286. Kros, J.M., van Run, P.R., Alers, J.C., Beverloo, H.B., van den Bent, M.J., Avezaat, C.J., van, D.H. Genetic aberrations in oligodendroglial tumours: an analysis using comparative genomic hybridization (CGH). J Pathol. 188:282-288, 1999.

287. Krouwer, H.G., van Duinen, S.G., Kamphorst, W., van der Valk, P., Algra, A. Oligoastrocytomas: a clinicopathological study of 52 cases. J Neurooncol. 33:223-238, 1997.

288. Krtolica, K., Krajnovic, M., Usaj-Knezevic, S., Babic, D., Jovanovic, D., Dimitrijevic, B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. World J Gastroenterol. 13:1187-1194, 2007.

289. Kuester, D., El-Rifai, W., Peng, D., Ruemmele, P., Kroeckel, I., Peters, B., Moskaluk, C.A., Stolte, M., Monkemuller, K., Meyer, F., Schulz, H.U., Hartmann, A., Roessner, A., Schneider-Stock, R. Silencing of MGMT expression by promoter hypermethylation in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus. Cancer Lett. 275:117-126, 2009.

290. Kulke, M.H., Hornick, J.L., Frauenhoffer, C., Hooshmy, S., Ryan, D.P., Enzinger, P.C., Meyerhardt, J.A., Clark, J.W., Stuart, K., Fuchs, C.S., Redston, M.S. O6-methylguanine DNA methyltransferase deficiency and response to temozolomide-based therapy in patients with neuroendocrine tumors. Clin. Cancer Res. 15:338-345, 2009.

291. Kunwar, S., Mohapatra, G., Bollen, A., Lamborn, K.R., Prados, M., Feuerstein, B.G. Genetic subgroups of anaplastic astrocytomas correlate with patient age and survival. Cancer Res. 61:7683-7688, 2001.

292. Kuo, L.T., Kuo, K.T., Lee, M.J., Wei, C.C., Scaravilli, F., Tsai, J.C., Tseng, H.M., Kuo, M.F., Tu, Y.K. Correlation among pathology, genetic and epigenetic profiles, and clinical outcome in oligodendroglial tumors. Int. J Cancer 124:2872-2879, 2009.

293. Kwong, J., Lo, K.W., To, K.F., Teo, P.M., Johnson, P.J., Huang, D.P. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. Clin. Cancer Res. 8:131-137, 2002.

294. Kyzas, P.A., Denaxa-Kyza, D., Ioannidis, J.P. Almost all articles on cancer prognostic markers report statistically significant results. Eur. J Cancer 43:2559-2579, 2007.

295. Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D.R., Gokaslan, Z.L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F.F., McCutcheon, I.E., Hassenbusch, S.J., Holly, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D., Sawaya, R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. J Neurosurg 95:190-198, 2001.

296. Laigle-Donadey, F., Martin-Duverneuil, N., Lejeune, J., Crinière, E., Capelle, L., Duffau, H., Cornu, P., Broët, P., Kujas, M., Mokhtari, K., Carpentier, A., Sanson, M., Hoang-Xuan, K., Thillet, J., Delattre, J.Y. Correlations between molecular profile and radiologic pattern in oligodendroglial tumors. Neurology 63:2360-2362, 2004.

297. Laird, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. Nature Reviews 3:253-266, 2003.

298. Larjavaara, S., Mantyla, R., Salminen, T., Haapasalo, H., Raitanen, J., Jaaskelainen, J., Auvinen, A. Incidence of gliomas by anatomic location. Neuro. Oncol. 9:319-325, 2007.

299. Lavon, I., Fuchs, D., Efroni, G., Zelikovitch, B., Fellig, Y., Siegal, T. Novel mechanism whereby nuclear factor ƙB mediates DNA damage repair through regulation of O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase. Cancer Res. 67:8952-8959, 2007.

300. Lavon, I., Zrihan, D., Zelikovitch, B., Fellig, Y., Fuchs, D., Soffer, D., Siegal, T. Longitudinal assessment of genetic and epigenetic markers in oligodendrogliomas. Clin. Cancer Res. 13:1429-1437, 2007.

301. Lazcoz, P., Munoz, J., Nistal, M., Pestana, A., Encio, I.J., Castresana, J.S. Loss of heterozygosity and microsatellite instability on chromosome arm 10q in neuroblastoma. Cancer Genet. Cytogenet. 174:1-8, 2007.

302. LeDoux, S.P., Williams, B.A., Hollensworth, B.S., Shen, C., Thomale, J., Rajewsky, M.F., Brent, T.P., Wilson, G.L. Glial cell-specific differences in repair of O6-Methylguanine. Cancer Res. 56:5615-5619, 1996.

303. Lee, E.S., Issa, J.P., Roberts, D.B., Williams, M.D., Weber, R.S., Kies, M.S., El-Naggar, A.K. Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. Clin. Cancer Res. 14:2664-2672, 2008.

304. Lee, G.W., Kang, J.H., Kim, I.S., Kim, H.G., Ko, G.H., Lee, J.H., Kim, D.C., Song, D.H., Yang, J.W., Lee, J.S. Is inactivation of O(6)-methylguanine DNA methyltransferase still a favorable prognostic factor of patients with diffuse large B-cell lymphoma in the era of R-CHOP chemotherapy? Leuk. Lymphoma 50:1992-1998, 2009.

305. Lee, S., Kim, W.H., Jung, H.Y., Yang, M.H., Kang, G.H. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. Am. J Pathol. 161:1015-1022, 2002.

306. Lee, H.S., Lee, H.K., Kim, H.S., Yang, H.K., Kim, W.H. Tumour suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. J Pathol. 200:39-46, 2003.

307. Lee, S.M., Lee, E.J., Ko, Y.H., Lee, S.H., Maeng, L., Kim, K.M. Prognostic significance of O6-methylguanine DNA methyltransferase and p57 methylation in patients with diffuse large B-cell lymphomas. APMIS 117:87-94, 2009.

308. Lee, S.M., Reid, H., Elder, R.H., Thatcher, N., Margison, G.P. Inter- and intracellular heterogeneity of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase expression in human brain tumours: possible significance in nitrosourea therapy. Carcinogenesis 17:637-641, 1996.

309. Leeflang, M.M., Debets-Ossenkopp, Y.J., Visser, C.E., Scholten, R.J., Hooft, L., Bijlmer, H.A., Reitsma, J.B., Bossuyt, P.M., Vyenbroucke-Grauls, C.M. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. Cochrane. Database. Syst. Rev.: CD007394, 2008.

310. Leeflang, M.M., Deeks, J.J., Gatsonis, C., Bossuyt, P.M. Systematic reviews of diagnostic test accuracy. Ann. Intern. Med. 149:889-897, 2008.

311. Leeflang, M.M., Scholten, R.J., Rutjes, A.W., Reitsma, J.B., Bossuyt, P.M. Use of methodological search filters to identify diagnostic accuracy studies can lead to the omission of relevant studies. J Clin. Epidemiol. 59:234-240, 2006.

312. Leenstra, S., Oskam, N.T., Bijleveld, E.H., Bosch, D.A., Troost, D., Hulsebos, T.J.M. Genetic subtypes of human malignant astrocytoma correlate with survival. Int. J. Cancer 79:159-165, 1998.

313. Lenz, G., Hutter, G., Hiddemann, W., Dreyling, M. Promoter methylation and expression of DNA repair genes hMLH1 and MGMT in acute myeloid leukemia. Ann. Hematol., 83:628-633, 2004.

314. Levin, N., Lavon, I., Zelikovitch, B., Fuchs, D., Bokstein, F., Fellig, Y., Siegal, T. Progressive low-grade oligodendrogliomas. Response to Temozolamide and correlation between genetic profile and O6-methilguanine DNA Methyltransferase protein expression. Cancer 106:1759-1765, 2006.

315. Lim, A., Li, B.F.L. The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications. EMBO J. 15:4050-4060, 1996.

316. Lin, Z., Gao, M., Zhang, X., Kim, Y.S., Lee, E.S., Kim, H.K., Kim, I. The hypermethylation and protein expression of p16 INK4A and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions. J Cancer Res. Clin. Oncol. 131:364-370, 2005.

317. Liu, L., Gerson, S.L. Targeted modulation of MGMT: clinical implications. Clin. Cancer Res. 12:328-331, 2006.

318. Lleonart, M.E., Garcia-Foncillas, J., Sanchez-Prieto, R., Martin, P., Moreno, A., Salas, C., Cajal, S. Microsatellite instability and p53 mutations in sporadic right and left colon carcinoma: different clinical and molecular implications. Cancer 83:889-895, 1998.

319. Lobo, A., Ezquerra, J., Gomez, B.F., Sala, J.M., Seva, D.A. [Cognocitive mini-test (a simple practical test to detect intellectual changes in medical patients)]. Actas Luso. Esp. Neurol. Psiquiatr. Cienc. Afines 7:189-202, 1979.

320. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K. (Eds.) The WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. International Agency for Research on Cancer, Lyon: IARC Press, 2007.

321. Lorente, A., Mueller, W., Urdangarin, E., Lazcoz, P., Lass, U., von, D.A., Castresana, J.S. RASSF1A, BLU, NORE1A, PTEN and MGMT expression and promoter methylation in gliomas and glioma cell lines and evidence of deregulated expression of de novo DNMTs. Brain Pathol. 19:279-292, 2009.

322. Ma, S., Egyházi, S., Ueno, T., Lindholm, C., Kreklau, E.L., Stierner, U., Ringborg, U., Hansson, J. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase expression and gene polymorphisms in relation to chemotherapeutic response in metastatic melanoma. Br. J. Cancer 89:1517-1523, 2003.

323. Ma, L.C., Kuo, C.C., Liu, J.F., Chen, L.T., Chang, J.Y. Transcriptional repression of O6-methylguanine DNA methyltransferase gene rendering cells hypersensitive to N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosurea in camptothecin-resistant cells. Mol Pharmacol. 74:517-526, 2008.

324. Macdonald, D.R., Cascino, T.L., Schold, S.C.Jr., Cairncross, J.G. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. J. Clin. Oncol. 8:1277-1280, 1990.

325. Maier, D., Comparone, D., Taylor, E., Zhang, Z., Gratzl, O., Van Meir, E.G., Scott, R.J., Merlo, A. New deletion in low-grade oligodendrglioma at the glioblastoma suppressor locus chromosome 10q25-2. Oncogene 15:997-1000, 1997.

326. Margison, G.P., Povey, A.C., Kaina, B., Santibáñez Korel, M.F. Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. Carcinogenesis 24:625-635, 2003.

327. Martin, P., Garcia-Cosio, M., Santon, A., Bellas, C. Aberrant gene promoter methylation in plasma cell dyscrasias. Exp. Mol Pathol. 84:256-261, 2008.

328. Martin, P., Santon, A., Garcia-Cosio, M., Bellas, C. hMLH1 and MGMT inactivation as a mechanism of tumorigenesis in monoclonal gammopathies. Mod. Pathol. 19:914-921, 2006.

329. Martinez, R., Esteller, M. The DNA methylome of glioblastoma multiforme. Neurobiol. Dis. 39:40-6, 2010.

330. Martinez, R., Schackert, G., Yaya-Tur, R., Rojas-Marcos, I., Herman, J.G., Esteller, M. Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme. J Neurooncol. 83:91-93, 2007.

331. Martone, T., Gillio-Tos, A., De, M.L., Fiano, V., Maule, M., Cavalot, A., Garzaro, M., Merletti, F., Cortesina, G. Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas. Clin. Cancer Res. 13:5089-5094, 2007.

332. Maruyama, R., Toyooka, S., Toyooka, K.O., Virmani, A.K., Zöchbauer-Müller, S., Farinas, A.J., Minna, J.D., McConnell, J., Frenkel, E.P., Gazdar, A.F. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. Clin. Cancer Res. 8:514-519, 2001.

333. Matsukura, S., Miyazaki, K., Yakushiji, H., Ogawa, A., Chen, Y., Sekiguchi, M. Combined loss of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and hMNH1 accelerates progression of hepatocellular carcinoma. J. Surg. Oncol. 82:194-200, 2003.

334. Matsukura, S., Miyazaki, K., Yakushiji, H., Ogawa, A., Harimaya, K., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. Expression and prognostic significance of O6-Methylguanine-DNA methyltransefarse in hepatocellular, gastric, and breast cancers. Ann. Surg. Oncol. 8:807-816, 2001.

335. Matsukura, S., Soejima, H., Nakagawachi, T., Yakushiji, H., Ogawa, A., Fukuhara, M., Miyazaki, K., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Mukai, T. CpG methylation of MGMT and hMLH1 promoter in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis viral infection. Br. J Cancer 88:521-529, 2003.

336. Maxwell, J.A., Johnson, S.P., Quinn, A., McLendon, R.E., Ali-Osman, F., Friedman, A.H., Herndon II, J.E., Bierau, K., Bigley, J., Bigner, D.D., Friedman, H.S. Quantitative analysis of O6-alkylguanine-DNA alkyltransefarse in malignant glioma. Mol Cancer Ther 5:2531-2539, 2006.

337. McCormack, A.I., McDonald, K.L., Gill, A.J., Clark, S.J., Burt, M.G., Campbell, K.A., Braund, W.J., Little, N.S., Cook, R.J., Grossman, A.B., Robinson, B.G., Clifton-Bligh, R.J. Low O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression and response to temozolomide in aggressive pituitary tumours. Clin. Endocrinol. (Oxf) 71:226-233, 2009.

338. McDonald, J.M., See, S.J., Tremont, I.W., Colman, H., Gilbert, M.R., Groves, M., Burger, P.C., Louis, D.N., Giannini, C., Fuller, G., Passe, S., Blair, H., Jenkins, R.B., Yang, H., Ledoux, A., Aaron, J., Tipnis, U., Zhang, W., Hess, K. The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors. Cancer 104:1468-1477, 2005.

339. McGirt, M.J., Villavicencio, A.T., Bulsara, K.R., Friedman, A.H. MRI-guided stereotactic biopsy in the diagnosis of glioma: comparison of biopsy and surgical resection specimen. Surg Neurol 59:277-282, 2003.

340. McLendon, R.E., Clevely, L., Pegram, C., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Friedman, H.S. Immunohistochemical detection of the DNA repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase in formalin-fixed, paraffin-embedded astrocytomas. Lab. Invest. 78:643-644, 1998.

341. McLendon, R.E., Herndon, J.E., West, B., Reardon, D., Rodney, W., Rasheed, A., Quinn, J., Friedman, H.S., Friedman, A.H., Bigner, D.D. Survival analysis of presumptive prognostic markers among oligodendrogliomas. Cancer 104:1693-1699, 2005.

342. McShane, L.M., Altman, D.G., Sauerbrei, W., Taube, S.E., Gion, M., Clark, G.M. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). Eur. J Cancer 41:1690-1696, 2005.

343. Meads, C.A., Davenport, C.F. Quality assessment of diagnostic before-after studies: development of methodology in the context of a systematic review. BMC Med. Res. Methodol. 9:3, 2009.

344. Megyesi, J.F., Kachur, E., Lee, D.H., Zlatescu, M.C., Betensky, R.A., Forsyth, P.A., Okada, Y., Sasaki, H., Mizoguchi, M., Louis, D.N., Cairncross, J.G. Imaging correlates of molecular signatures in oligodendrogliomas. Clin. Cancer Res. 10:4303-4306, 2004.

345. Mellai, M., Caldera, V., Annovazzi, L., Chio, A., Lanotte, M., Cassoni, P., Finocchiaro, G., Schiffer, D. MGMT promoter hypermethylation in a series of 104 glioblastomas. Cancer Genomics Proteomics. 6:219-227, 2009.

346. Merlin, T., Weston, A., Tooher, R. Extending an evidence hierarchy to include topics other than treatment: revising the Australian 'levels of evidence'. BMC Med. Res. Methodol. 9:34, 2009.

347. Metellus, P., Coulibaly, B., Nanni, I., Fina, F., Eudes, N., Giorgi, R., Barrie, M., Chinot, O., Fuentes, S., Dufour, H., Ouafik, L., Figarella-Branger, D. Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort. Cancer 115:4783-4794, 2009.

348. Middleton, M.R., Lee, S.M., Arance, A., Wood, M., Thatcher, N., Margison, G.P. O6-methylguanine formation, repair protein depletion and clinical outcome with a 4 hr schedule of temozolomide in the treatment of advanced melanoma: results of a phase II study. Int. J Cancer 88:469-473, 2000.

349. Mikami, T., Yoshida, T., Numata, Y., Shiraishi, H., Araki, K., Guiot, M.C., Jass, J.R., Okayasu, I. Low frequency of promoter methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and hMLH1 in ulcerative colitis-associated tumors: comparison with sporadic colonic tumors. Am. J Clin. Pathol. 127:366-373, 2007.

350. Mikeska, T., Bock, C., El-Maarri, O., Hubner, A., Ehrentraut, D., Schramm, J., Felsberg, J., Kahl, P., Buttner, R., Pietsch, T., Waha, A. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. J Mol Diagn 9:368-381, 2007.

351. Mineura, K., Yanagisawa, T., Watanabe, K., Kowada, M., Yasui, N. Human brain tumor O6-Methylguanine-DNA methyltransferase mRNA and its significance as an indicator of selective chloroethylnitrosourea chemotherapy. Int. J. Cancer 69:420-425, 1996.

352. Mitchell, P., Ellison, D.W., Mendelow, A.D. Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics. Lancet Neurol. 4:413-422, 2005.

353. Miwa, T., Hirose, Y., Sasaki, H., Ikeda, E., Yoshida, K., Kawase, T. Genetic characterization of adult infratentorial gliomas. J Neurooncol. 91:251-255, 2009.

354. Moher, D., Cook, D.J., Eastwood, S., Olkin, I., Rennie, D., Stroup, D.F. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomized controlled trials: the QUOROM statement. QUOROM Group. Br. J Surg. 87:1448-1454, 2000.

355. Moher, D., Olkin, I. Meta-analysis of randomized controlled trials. A concern for standards. JAMA 274:1962-1964, 1995.

356. Möllemann, M., Wolter, M., Felsberg, J., Collins, V.P., Reifenberger, G. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. Int. J. Cancer 113:379-385, 2005.

357. Montori, V.M., Guyatt, G.H. Intention-to-treat principle. Can. Med. Assoc. J. 165:1339-1341, 2001.

358. Moses, L.E., Shapiro, D., Littenberg, B. Combining independent studies of a diagnostic test into a summary ROC curve: data-analytic approaches and some additional considerations. Stat. Med. 12:1293-1316, 1993.

359. Mueller, W., Hartmann, C., Hoffmann, A., Lanksch, W., Kiwith, J., Tonn, J., Veelken, J., Schramm, J., Weller, M., Wiestler, O.D., Louis, D.N., von Deimling, A. Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. Am. J. Pathol. 161:313-319, 2002.

360. Mueller, W., Nutt, C.L., Ehrich, M., Riemenschneider, M.J., von Deimling, A., van den Boom, D., Louis, D.N. Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. Oncogene 26:583-593, 2007.

361. Mukasa, A., Ueki, K., Matsumoto, S., Tsutsumi, S., Nishikawa, R., Fujimaki, T., Asai, A., Kirino, T., Aburatani, H. Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. Oncogene 21:3961-3968, 2002.

362. Munot, K., Bell, S.M., Lane, S., Horgan, K., Hanby, A.M., Speirs, V. Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer. Hum. Pathol. 37:989-999, 2006.

363. Murakami, J., Asaumi, J.-I., Maki, Y., Tsujigiwa, H., Nagatsuka, H., Kokeguchi, S., Inoue, T., Kawasaki, S., Tanaka, N., MacPhee, D., Matsubara, N., Kishi, K. Influence of CpG island methylation status in O6-Methylguanine- DNA methyltransferase expression of oral cancer cell lines. Oncol. Reports 12:339-345, 2004.

364. Nagane, M., Kobayashi, K., Ohnishi, A., Shimizu, S., Shiokawa, Y. Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression in patients with recurrent glioblastoma treated with temozolomide. Jpn. J Clin. Oncol. 37:897-906, 2007.

365. Nagarajan, R.P., Costello, J.F. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. Semin. Cancer Biol. 19:188-197, 2009.

366. Nagasaka, T., Goel, A., Notohara, K., Takahata, T., Sasamoto, H., Uchida, T., Nishida, N., Tanaka, N., Boly, C.R., Matsubara, N. Methylation pattern of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis. Int. J Cancer 122:2429-2436, 2008.

367. Nakagawa, T., Ido, K., Sakuma, T., Takeuchi, H., Sato, K., Kubota, T. Prognostic significance of the immunohistochemical expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein-1 in glioblastomas. Neuropathology 29:388, 2009.

368. Nagasaka, T., Sharp, G.B., Notohara, K., Kambara, T., Sasamoto, H., Isozaki, H., MacPhee, D.G., Jass, J.R., Tanaka, N., Matsubara, N. Hypermethylation of O6-Methylguanine-DNA methyltransefarse promoter may predict nonrecurrence after chemotherapy in colorectal cancecasesr cases. Clin. Cancer Res. 9:5306-5312, 2003.

369. Nakamura, M., Konishi, N., Tsunoda, S., Hiasa, Y., Tsuzuki, T., Inui, T., Sakaki, T. Retinoblastoma protein expression and MIB-1 correlate with survival of patients with malignant astrocytoma. Cancer 80:242-249, 1997.

370. Nakagawa, T., Ido, K., Sakuma, T., Takeuchi, H., Sato, K., Kubota, T. Prognostic significance of the immunohistochemical expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein-1 in glioblastomas. Neuropathology 29:388, 2009.

371. Nakagawachi, T., Soejima, H., Urano, T., Zhao, W., Higashimoto, K., Satoh, Y., Matsukura, S., Kudo, S., Kitajima, Y., Harada, H., Furukawa, K., Matsuzaki, H., Emi, M.,

Nakabeppu, Y., Miyakazi, K., Sekiguchi, M., Mukai, T. Silencing effect of GpG island hypermethylation and histone modifications on O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. Oncogene 22:8835-8844, 2003.

372. Nakamichi, I., Tomita, Y., Zhang, B., Sugiyama, H., Kanakura, Y., Fukuhara, S., Hino, M., Kanamaru, A., Ogawa, H., Aozasa, K. Correlation between promoter hypermethylation of GSTP1 and response to chemotherapy in diffuse large B cell lymphoma. Ann. Hematol. 86:557-564, 2007.

373. Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C -A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. Carcinogenesis 22:1715-1719, 2001.

374. Nakasu, S., Fukami, T., Baba, K., Matsuda, M. Immunohistochemical study for O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in the non-neoplastic and neoplastic components of gliomas. J. Neurooncol. 70:333-340, 2004.

375. Nakasu, S., Fukami, T., Jito, J., Matsuda, M. Prognostic significance of loss of O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in supratentorial diffuse low-grade astrocytoma. Surg. Neurol. 68:603-608, 2007.

376. Napieralski, R., Ott, K., Kremer, M., Becker, K., Boulesteix, A.L., Lordick, F., Siewert, J.R., Hofler, H., Keller, G. Methylation of tumor-related genes in neoadjuvant-treated gastric cancer: relation to therapy response and clinicopathologic and molecular features. Clin. Cancer Res. 13:5095-5102, 2007.

377. NCCN adult brain tumor practice guidelines 2010. www.nccn.org

378. Newcomb, E.W., Cohen, H., Lee, S.R., Bhalla, S.K., Bloom, J., Hayes, R.L., Miller, D.C. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. Brain Pathol. 8:667, 1998.

379. Ngo, T.T., Peng, T., Liang, X.J., Akeju, O., Pastorino, S., Zhang, W., Kotliarov, Y., Zenklusen, J.C., Fine, H.A., Maric, D., Wen, P.Y., De, G.U., Black, P.M., Wu, W.W., Shen, R.F., Jeffries, N.O., Kang, D.W., Park, J.K. The 1p-encoded protein stathmin and resistance of malignant gliomas to nitrosoureas. J Natl. Cancer Inst. 99:639-652, 2007.

380. Ntzani, E.E., Ioannidis, J.P. Predictive ability of DNA microarrays for cancer outcomes and correlates: an empirical assessment. Lancet 362:1439-1444, 2003.

381. Nutt, C.L. Molecular genetics of oligodendrogliomas: a model for improved clinical management in the field of neurooncology. Neurosurg Focus. 19:E2, 2005.

382. Ogawa, T., Yoshida, T., Tsuruta, T., Saigenji, K., Okayasu, I. Genetic instability on chromosome 17 in the epithelium of non-polypoid colorectal carcinomas compared to polypoid lesions. Cancer Sci. 97:1335-1342, 2006.

383. Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmyam, M., Cantor, M., Kirkner, G.J., Spiegelman, D., Makrigiorgos, G.M., Weisenberger, D.J., Laird, P.W., Loda, M., Fuchs, C.S. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. J Mol Diagn 8:209-217, 2006.

384. Ogino, S., Meyerhardt, J.A., Kawasaki, T., Clark, J.W., Ryan, D.P., Kulke, M.H., Enzinger, P.C., Wolpin, B.M., Loda, M., Fuchs, C.S. CpG island methylation, response to combination chemotherapy, and patient survival in advanced microsatellite stable colorectal carcinoma. Virchows Arch. 450:529-537, 2007.

385. Ohe, N., Saio, M., Kijima, M., Tamakawa, N., Suwa, T., Kojima, Y., Yano, H., Kaku, Y., Iwama, T., Shinoda, J., Sakai, N., Takami, T. In situ detection of O6-Methylguanine-DNA methyltransferase messenger RNA in paraffin-embedded human astrocytic tumor tissues by nested in situ RT-PCR is useful in predicting chemotherapy resistance of tumors. Int. J Oncol. 22:543-549, 2003.

386. Ohgaki, H., Kleihues, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 64:479-489, 2005.

387. Ohgaki, H., Olivier, M., Hainaut, P. Li-Fraumeni syndrome and TP53 germline mutations. In: Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D. y Cavenee, W.K. (Eds.) WHO classification of tumors of the central nervous system, Lyon: International Agency for Research on Cancer: IARC Press, 2007, pp. 222-225.

388. Ohno, T., Hiraga, J., Ohashi, H., Sugisaki, C., Li, E., Asano, H., Ito, T., Nagai, H., Yamashita, Y., Mori, N., Kinoshita, T., Naoe, T. Loss of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression is a favorable prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma. Int. J Hematol. 83:341-347, 2006.

389. Okamoto, Y., Di Patre, P.L., Burkhard, C., Horstmann, S., Jourde, B., Fahey, M., Schuler, D., Probst-Hensch, N.M., Yasargil, M.G., Yonekawa, Y., Lutolf, U.M., Kleihues, P., Ohgaki, H. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. Acta Neuropathol. 108:49-56, 2004.

390. Olson, J.J., Barnett, D., Yang, J., Assietti, R., Cotsonis, G., James, C.D. Gene amplification as a prognostic factor in primary brain tumors. Clin. Cancer Res. 4:215-222, 1998.

391. Ortiz, Z. ¿Qué son las revisiones sietmáticas? Publicaciones CIE. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires., 2005.

392. Osanai, T., Takagi, Y., Toriya, Y., Nakagawa, T., Aruga, T., Iida, S., Uetake, H., Sugihara, K. Inverse correlation between the expression of O6-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT) and p53 in breast cancer. Jpn. J Clin. Oncol. 35:121-125, 2005.

393. Osborn, A.G. Astrocytoma and other glial neoplasms. En: Patterson, A.S. (Ed.) Diagnostic neuroradiology, St.Louis, Missouri 63146: Mosby-Year Book, Inc., 1994, pp. 529-578.

394. Park, T.J., Han, S.U., Cho, Y.K., Paik, W.K., Kim, Y.B., Lim, I.K. Methylation of O6-Methylguanine-DNA methyltransferase gene is associated significantly with K-ras mutation,

lymph node invasion, tumor staging, and disease free survival in patients with gastric carcinoma. Cancer 92:2760-2768, 2001.

395. Park, C.K., Lee, S.H., Han, J.H., Kim, C.Y., Kim, D.W., Paek, S.H., Kim, D.G., Heo, D.S., Kim, I.H., Jung, H.W. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in WHO grade III glioma patients treated with radiotherapy or radiotherapy plus chemotherapy. BMC Cancer 9:450, 2009.

396. Parkinson, J.F., Wheeler, H.R., Clarkson, A., Mckenkie, C.A., Biggs, M.T., Little, N.S., Cook, R.C., Messina, M., Robinson, B.G., McDonald, K.L. Variation of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples of glioblastoma. J. Neurooncol. 87:71-78, 2008.

397. Parkinson, J.F., Wheeler, H.T., McDonald, K.L. Contribution of DNA repair mechanisms to determining chemotherapy response in high-grade glioma. J Clin. Neurosci. 15:1-8, 2008.

398. Passagne, I., Evrard, A., Depeille, P., Cuq, P., Cupissol, D., Vian, L. O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase (MGMT) overexpression in melanoma cells induces resistance to nitrosoureas and temozolomide but sensitizes to mitomycin C. Toxicol. Appl. Pharmacol. 211:97-105, 2006.

399. Paz, M.F., Fraga, M.F., Avila, S., Guo, M., Pollan, M., Herman, J.G., Esteller, M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. Cancer Res. 63:1114-1121, 2003.

400. Paz, M.F., Yaya-Tur, R., Rojas-Marcos, I., Reynes, G., Pollan, M., Aguirre-Cruz, L., García-Lopez, J.L., Piquer, J., Safont, M.J., Balaña, C., Sanchez-Cespedes, M., Garcia-Villanueva, M., Arribas, L., Esteller, M. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to Temozolamide in primary gliomas. Clin. Cancer Res. 10:4933-4938, 2004.

401. Pegg, A.E. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. Mutat. Res. 462:83-100, 2000.

402. Pegg, A.E., Dolan, M.E., Moschel, R.C. Structure, function, and inhibition of O6-Alkylguanine-DNA alkyltransferase. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 51:167-223, 1995.

403. Perry, A., Jenkins, R.B., O´Fallon, J.R., Schaefer, P.L., Kimmel, D.W., Mahoney, M.R., Scheithauer, B.W., Smith, S.M., Hill, E.M., Sebo, T.J., Levitt, R., Krook, J., Tschetter, L.K., Morton, R.F., Buckner, J.C. Clinicopathologic study of 85 similarly treated patients with anaplastic astrocytic tumors. An analysis of DNA content (ploidy), cellular proliferation, and p53 expression. Cancer 86:672-683, 1999.

404. Pieper, R.O. Understanding and manipulating O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression. Pharmacology and Therapeutics 74:285-297, 1997.

405. Pieper, R.O., Patel, S., Ting, S.A., Futscher, B.W., Costello, J.F. Methylation of CpG island transcription factor binding sites is unnecessary for aberrant silencing of the human MGMT gene. J Biol. Chem. 271:13916-13924, 1996.

406. Piepmeier, J.M. The future of neuro-oncology. Acta Neurochir. (Wien.) 151:1343-1348, 2009.

407. Piperi, C., Themistocleous, M.S., Papavassiliou, G.A., Farmaki, E., Levidou, G., Korkolopoulou, P., Adamopoulos, C., Papavassiliou, A.G. High Incidence of MGMT and RARbeta Promoter Methylation in Primary Glioblastomas: Association with Histopathological Characteristics, Inflammatory Mediators and Clinical Outcome. Mol Med. 16:1-9, 2010.

408. Pollack, I.F., Hamilton, R.L., Sobol, R.W., Burnham, J., Yates, A.J., Holmes, E.J., Zhou, T., Finlay, J.L. O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression strongly correlates with outcome in childhood malignant gliomas: results from the CCG-945 Cohort. J Clin. Oncol. 24:3431-3437, 2006.

409. Popko, B., Pearl, D.K., Walker, D.M., Comas, T.C., Baerwald, K.D., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., Yates, A.J. Molecular markers that identify human astrocytomas and oligodendrogliomas. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 61:329-338, 2002.

410. Prados, M.D., Chang, S.M., Butowski, N., DeBoer, R., Parvataneni, R., Carliner, H., Kabuubi, P., Ayers-Ringler, J., Rabbitt, J., Page, M., Fedoroff, A., Sneed, P.K., Berger, M.S., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Vyenberg, S., James, C.D., Lamborn, K.R., Stokoe, D., Haas-Kogan, D.A. Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. J Clin. Oncol. 27:579-584, 2009.

411. Preuss, I., Eberhagen, I., Haas, S., Eibl, R.H., Kaufmann, M., von Minckwitz, G. O6-Methylguanine-DNA methyltransefarse activity in breast and brain tumors. Int. J. Cancer 61:321-326, 1995.

412. Preuss, I., Thust, R., Kaina, B. Protective effect of O6-Methylguanine-DNA methyltransefarse (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs. Int. J. Cancer 65:506-512, 1996.

413. Preusser, M. MGMT analysis at DNA, RNA and protein levels in glioblastoma tissue. Histol. Histopathol. 24:511-518, 2009.

414. Preusser, M., Charles, J.R., Felsberg, J., Reifenberger, G., Hamou, M.F., Diserens, A.C., Stupp, R., Gorlia, T., Marosi, C., Heinzl, H., Hainfellner, J.A., Hegi, M. Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. Brain Pathol. 18:520-532, 2008.

415. Preusser, M., Elezi, L., Hainfellner, J.A. Reliability and reproducibility of PCR-based testing of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) promoter methylation status in formalin-fixed and paraffin-embedded neurosurgical biopsy specimens. Clin. Neuropathol. 27:388-390, 2008.

416. Puduvalli, V.K., Hashmi, M., McAllister, L.D., Levin, V.A., Hess, K.R., Prados, M., Jaeckle, K.A., Yung, W.K., Buys, S.S., Bruner, J.M., Townsend, J.J., Davis, R., Sawaya, R., Kyritsis, A.P. Anaplastic oligodendrogliomas: prognostic factors for tumor recurrence and survival. Oncology 65:259-266, 2003.

417. Pulling, L.C., Divine, K.K., Klinge, D.M., Gillily, F.D., Kang, T., Schwartz, A.G., Bocklage, T.J., Belinsky, S.A. Promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: more common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression. Cancer Res. 63:4842-4848, 2003.

418. Puri, S.K., Si, L., Fan, C.Y., Hanna, E. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. Am. J Otolaryngol. 26:12-17, 2005.

419. Qi, J., Zhu, Y.Q., Huang, M.F., Yang, D. Hypermethylation of CpG island in O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene was associated with K-ras G to A mutation in colorectal tumor. World J Gastroenterol. 11:2022-2025, 2005.

420. Qian, X., von Wronski, A., Brent, T.P. Localization of methylation sites in the human O6-Methylguanine-DNA methyltransferase promoter: correlation with gene suppression. Carcinogenesis 16:1385-1390, 1995.

421. Qian, X.C., Brent, T.P. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. Cancer Res. 57:3672-3677, 1997.

422. Qu, M., Olofsson, T., Sigurdardottir, S., You, C., Kalimo, H., Nister, M., Smits, A., Ren, Z.P. Genetically distinct astrocytic and oligodendroglial components in oligoastrocytomas. Acta Neuropathol. 113:129-136, 2007.

423. Rainov, N.G., Dobberstein, K.U., Bahn, H., Holzhausen, H.J., Lautenschlager, C., Heidecke, V., Burket, W. Prognostic factors in malignant gliomas: influence of the overexpression of oncogene and tumor-supressor gene poducts on survival. J. Neurooncol. 35:13-28, 1997.

424. Ralte, A.M., Sharma, M.C., Karak, A.K., Mehta, V.S., Sarkar, C. Clinicopathological features, MIB-1 labeling index and apoptotic index in recurrent astrocytic tumors. Oncol. Res. 7:267-278, 2001.

425. Ramirez, C., Bowman, C., Maurage, C.A., Dubois, F., Blond, S., Porchet, N., Escye, F. Loss of 1p, 19q, and 10q heterozygosity prospectively predicts prognosis of

oligodendroglial tumors--towards individualized tumor treatment? Neuro. Oncol. 12:490-499, 2010.

426. Ramirez, J.L., Taron, M., Balana, C., Sarries, C., Mendez, P., de Aguirre, I., Nunez, L., Roig, B., Queralt, C., Botia, M., Rosell, R. Serum DNA as a tool for cancer patient management. Rocz. Akad. Med. Bialymst. 48:34-41, 2003.

427. Ransohoff, D.F. Rules of evidence for cancer molecular-marker discovery and validation. Nat. Rev. Cancer 4:309-314, 2004.

428. Rasheed, B.K., Wiltshire, R.N., Bigner, S.H., Bigner, D.D. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. Curr. Opin. Oncol. 11:162-167, 1999.

429. Rastetter, M., Schagdarsurengin, U., Lahtz, C., Fiedler, E., Marsch, W.C., Dammann, R., Helmbold, P. Frequent intra-tumoural heterogeneity of promoter hypermethylation in malignant melanoma. Histol. Histopathol. 22:1005-1015, 2007.

430. Reardon, D.A., Rich, J.N., Friedman, H.S., Bigner, D.D. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. J. Clin. Oncol. 24:1253-1265, 2006.

431. Reifenberger, G., Kros, J.M., Louis, D.N., Collins, V.P. Oligodendroglial tumors: Anaplastic oligodendroglioma. In: Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D. and Cavenee, W.K. (Eds.) WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System, Lyon: International Agency for Research on Cancer, IARC Press 2007, pp. 60-62.

432. Reifenberger, G., Louis, D.N. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. J Neuropathol. Exp. Neurol. 62:111-126, 2003.

433. Reifenberger, J., Reifenberger, G., Liu, L., James, C.D., Wechsler, W., Collins, V.P. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. Am. J. Pathol. 145:1175-1190, 1994.

434. Ren, Z.P., Olofsson, T., Qu, M., Hesselager, G., Soussi, T., Kalimo, H., Smits, A., Nister, M. Molecular genetic analysis of p53 intratumoral heterogeneity in human astrocytic brain tumors. J Neuropathol. Exp. Neurol. 66:944-954, 2007.

435. Riemenschneider, M.J., Reifenberger, G. Molecular neuropathology of gliomas. Int. J Mol Sci. 10:184-212, 2009.

436. Rietschel, P., Wolchok, J.D., Krown, S., Gerst, S., Jungbluth, A.A., Busam, K., Smith, K., Orlow, I., Panageas, K., Chapman, P.B. Phase II study of extended-dose temozolomide in patients with melanoma. J Clin. Oncol. 26:2299-2304, 2008.

437. Riley, R.D., Sauerbrei, W., Altman, D.G. Prognostic markers in cancer: the evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond. Br. J Cancer 100:1219-1229, 2009.

438. Rimel, B.J., Huettner, P., Powell, M.A., Mutch, D.G., Goodfellow, P.J. Absence of MGMT promoter methylation in endometrial cancer. Gynecol. Oncol. 112:224-228, 2009.

439. Rivera, A.L., Pelloski, C.E., Gilbert, M.R., Colman, H., De La Cruz, C., Sulman, E.P., Bekele, B.N., Aldape, K.D. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. Neuro. Oncol. 12:116-121, 2010.

440. Roberts, A., Pelton, J.G., Wemmer, D.E. Structural studies of MJ1529, an O6-methylguanine-DNA methyltransferase. Magn Reson. Chem. 44 Spec No:S71-S82, 2006.

441. Robertson, K.D., Jones, P.A. DNA methylation: past, present and furture directions. Carcinogenesis 21:461-467, 2000.

442. Rodriguez, F.J., Thibodeau, S.N., Jenkins, R.B., Schowalter, K.V., Caron, B.L., O´Neil, B.P., James, C.D., Passe, S., Slezak, J., Giannini, C. MGMT Immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 16:59-65, 2008.

443. Roessler, K., Gatterbauer, B., Becherer, A., Paul, M., Kletter, K., Prayer, D., Hoeftberger, R., Hainfellner, J., Asenbaum, S., Knosp, E. Surgical target selection in cerebral glioma surgery: linking methionine (MET) PET image fusion and neuronavigation. Minim. Invasive. Neurosurg 50:273-280, 2007.

444. Rolhion, C., Penault-Llorca, F., Kemeny, J.L., Kwiatkowski, F., Lemaire, J.J., Chollet, P., Finat-Duclos, F., Verrelle, P. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) expression in human glioblastomas in relation to patient characteristics and p53 accumulation. Int. J. Cancer 416:416-420, 1999.

445. Rood, B.R., Zhang, H., Cogen, P.H. Intercellular heterogeneity of expression of the MGMT DNA repair gene in pediatric medulloblastoma. Neuro-Oncology 6:200-207, 2004.

446. Rossi, D., Capello, D., Gloghini, A., Franceschetti, S., Paulli, M., Saglio, G., Vitolo, U., Pileri, S.A., Esteller, M., Carbone, A., Gaidano, G. Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia. Haematologia 89:154-164, 2004.

447. Sadones, J., Michotte, A., Veld, P., Chaskis, C., Sciot, R., Menten, J., Joossens, E.J., Strauven, T., D'Hondt, L.A., Sartenaer, D., Califice, S.F., Bierau, K., Svensson, C., De Grève J., Neyns, B. MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma. Eur. J Cancer 45:146-153, 2009.

448. Safar, A.M., Spencer, H., III, Su, X., Coffey, M., Cooney, C.A., Ratnasinghe, L.D., Hutchins, L.F., Fan, C.Y. Methylation profiling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system. Clin. Cancer Res. 11:4400-4405, 2005.

449. Safar, A.M., Spencer, H., Su, X., Cooney, C.A., Shwaiki, A., Fan, C.Y. Promoter hypermethylation for molecular nodal staging in non-small cell lung cancer. Arch. Pathol. Lab Med. 131:936-941, 2007.

450. Salcman, M., Nazzaro, J.M., Neuwelt, E.A., Hall, W.A. Treatment of de novo glioblastoma multiforme: radical removal and chemo- or radiotherapy vs. conservative

approaches. In: Origitano, T.C., Harkey, H.L. and al Mefty, O. (Eds.) Controversies in Neurosurgery, New York: Thieme Medical Publishers, 1996, pp. 64-73.

451. Salcman, M., Scholtz, H., Kaplan, R.S., Kulik, S. Long-term survival in patients with malignant astrocytoma. Neurosurgery 34:213-219, 1994.

452. Salminen, E., Nuutinen, J.M., Huhtala, S. Multivariate analysis of prognostic factors in 106 patients with malignant glioma. Eur. J. Cancer 32A:1918-1923, 1996.

453. Salmon, I., Dewitte, O., Pasteels, J.L., Flament-Dury, J., Brotchi, J., Vereerstraeten, P., Kiss, R. Prognostic scoring in adult astrocytic tumors using patient age, histopathological grade, and DNA histogram type. J. Neurosurg. 80:877-883, 1994.

454. Sanai, N., Berger, M.S. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. Neurosurgery 62:753-764, 2008.

455. Sanson, M., Leuraud, P., Marie, Y., Delattre, J.Y., Hoang-Xuan, K. Preferential loss of paternal 19q, but not 1p, alleles in oligodendrogliomas. Ann. Neurol. 52:105-107, 2002.

456. Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.Y. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. J Clin. Oncol. 27:4150-4154, 2009.

457. Sasai, K., Akagi, T., Aoyanagi, E., Tabu, K., Kaneko, S., Tanaka, S. O6-methylguanine-DNA methyltransferase is downregulated in transformed astrocyte cells: implications for anti-glioma therapies. Mol Cancer 6, 2007.

458. Sasai, K., Nodagashira, M., Aoyanagi, E., Wang, L., Katoh, M., Murata, J., Ozaki, Y., Ito, T., Fujimoto, S., Kaneko, S., Nagashima, K., Tanaka, S. Careful exclusion of non-neoplastic brain components is required for an appropiate evaluation of O6-methylguanine-DAN methyltransferase status in glioma. Am. J. Surg. Pathol. 32:1220-1227, 2008.

459. Sawamura, Y., de Tribolet, N. Can we cure gliomas? Limitations of treatment including surgery. In: Crockard, A., Haward, R. y Hoff, J.T. (Eds.) Neurosurgery. The scientific basis of clinical practice, Oxford: Blackwell Sciece Ltd., 2000, pp. 621-633.

460. Sawaya, R. Extent of resection in malignant gliomas: a critical summary. J. Neurooncol. 42:303-305, 1999.

461. Sawaya, R., Hammoud, M., Schoppa, D., Hess, K.R., Wu, S.Z., Shi, W.M., Wildrick, D.M. Neurosurgical outcomes in a modern series of 400 craniotomies for treatment of parenchymal tumors. Neurosurgery 42:1044-1055, 1998.

462. Schold, S.C., Jr., Kokkinakis, D.M., Chang, S.M., Berger, M.S., Hess, K.R., Schiff, D., Robins, H.I., Mehta, M.P., Fink, K.L., Davis, R.L., Prados, M.D. O6-benzylguanine suppression of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in anaplastic gliomas. Neuro. Oncol. 6:28-32, 2004.

463. Scott, J.N., Brasher, P.M.A., Sevick, R.J., Rewcastle, N.B., Forsyth, P.A. How often are nonenhancing supratentorial gliomas malignant? A population study. Neurology 59:947-949, 2002.

464. See, S.J., Gilbert, M.R. Anaplastic Astrocytoma: diagnosis, prognosis, and management. Semin. Oncol. 31:618-634, 2004.

465. Shaw, R.J., Hall, G.L., Lowe, D., Liloglou, T., Field, J.K., Sloan, P., Risk, J.M. The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: correlation of quantitative methylation data with gene expression. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 134:251-256, 2008.

466. Shaw, E.G., Scheithauer, B.W., O'Fallon, J.R., Tazelaar, H.D., Davis, D.H. Oligodendrogliomas: the Mayo Clinic experience. J Neurosurg. 76:428-434, 1992.

467. Shen, L., Kondo, Y., Rosner, G.L., Xiao, L., Supunpong Hernyez, N., Vilaythong, J., Houlihan, P.S., Krouse, R.S., Prasad, A.R., Einspahr, J.G., Buckmeier, J., Alberts, D.S.,

Hamilton, S.R., Issa, J-P.J. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. J. Natl. Cancer Inst. 97:1330-1338, 2005.

468. Shinoura, N., Chen, L., Wani, M.A., Kim, Y.G., Larson, J.J., Warnick, R.E., Simon, M., Menon, A.G., Bi, W.L., Stambrook, P.J. Protein and messenger RNA expression of connexin 43 in astrocytomas: implications in brain tumor gene therapy. J. Neurosurg. 84:839-845, 1996.

469. Silber, J.R., Blank, A., Bobola, M.S., Ghatan, S., Kolstoe, D.D., Berger, M.S. O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient phenotype in human gliomas: frequency and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy. Clin. Cancer Res. 5:807-814, 1999.

470. Silber, J.R., Blank, A., Bobola, M.S., Mueller, B.A., Kolstoe, D.D., Ojemann, G.A., Berger, M.S. Lack of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransefrase in histologically normal brain adjacent to primary brain tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:6941-6946, 1996.

471. Silber, J.R., Bobola, M.S., Ghatan, S., Douglas, A.B., Kolstoe, D.D., Berger, M. O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics. Cancer Res. 58:1068-1073, 1998.

472. Silber, J.R., Mueller, B.A., Ewers, T.G., Berger, M.S. Comparison of O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in brain tumors and adjacent normal brain. Cancer Res. 53:3416-3420, 1993.

473. Smith, R. Where is the wisdom...? BMJ 303:798-799, 1991.

474. Smith, J.S., Alderete, B., Minn, Y., Borell, T.J., Perry, A., Mohapatra, G., Hosek, S.M., Kimmel, D., O'Fallon, J., Yates, A., Feuerstein, B.G., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., Jenkins, R.B. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. Oncogene 18:4144-4152, 1999.

475. Smith, J.S., Jenkins, R.B. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. Front Biosci. 5:213-231, 2000.

476. Smith, J.S., Perry, A., Borell, T.J., Lee, H.K., O´Fallon, J., Hosek, S.M., Kimmel, D., Yates, A., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., Jenkins, R.B. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas and mixed oligoastrocytomas. J. Clin. Oncol. 18:636-645, 2000.

477. Smith-Sorensen, B., Lind, G.E., Skotheim, R.I., Fossa, S.D., Fodstad, O., Stenwig, A.-E., Jakobsen, K.S., Lothe, R.A. Frequent promoter hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. Oncogene 21:8878-8884, 2002.

478. Snuderl, M., Eichler, A.F., Ligon, K.L., Vu, Q.U., Silver, M., Betensky, R.A., Ligon, A.H., Wen, P.Y., Louis, D.N., Iafrate, A.J. Polysomy for chromosomes 1 and 19 predicts earlier recurrence in anaplastic oligodendrogliomas with concurrent 1p/19q loss. Clin. Cancer Res. 15:6430-6437, 2009.

479. Soejima, H., Zhao, W., Mukai, T. Epigenetic silencing of the MGMT gene in cancer. Biochem. Cell Biol. 83:429-437, 2005.

480. Song, F., Khan, K.S., Dinnes, J., Sutton, A.J. Asymmetric funnel plots and publication bias in meta-analyses of diagnostic accuracy. Int. J Epidemiol. 31:88-95, 2002.

481. Sonoda, Y., Kumabe, T., Watanabe, M., Nakazato, Y., Inoue, T., Kanamori, M., Tominaga, T. Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. Acta Neurochir. (Wien.) 151:1349-1358, 2009.

482. Sonoda, Y., Yokosawa, M., Saito, R., Kanamori, M., Yamashita, Y., Kumabe, T., Watanabe, M., Tominaga, T. O (6)-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma. Int. J Clin. Oncol. 15:352-358, 2010.

483. Spiegl-Kreinecker, S., Pirker, C., Filipits, M., Lotsch, D., Buchroithner, J., Pichler, J., Silye, R., Weis, S., Micksche, M., Fischer, J., Berger, W. O6-Methylguanine DNA

methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients. Neuro. Oncol. 12:28-36, 2010.

484. Srivenugopal, K.S., Mullapudi, S.R., Shou, J., Hazra, T.K., Ali-Osman, F. Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells. Cancer Res. 60:282-287, 2000.

485. Srivenugopal, K.S., Shou, J., Mullapudi, S.R.S., Lang, F.F.J., Rao, J.S., Ali-Osman, F. Enforced expression of wild-type p53 curtails the transcription of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in human tumor cells and enhances their sensitivity to alkylating agents. Clin. Cancer Res. 7:1398-1409, 2001.

486. Srivenugopal, K.S., Yuan, X., Friedman, H.S., Ali-Osman, F. Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2chloroethyl)-1-nitrosourea. Biochemistry 35:1328-1334, 1996.

487. Stadlbauer, A., Gruber, S., Nimsky, C., Fahlbusch, R., Hammen, T., Buslei, R., Tomyl, B., Moser, E., Ganslyt, O. Preoperative grading of gliomas by using metabolite quantification with high-spatial-resolution proton MR spectroscopic imaging. Radiology 238:958-969, 2006.

488. Sterne, J.A., Egger, M. Funnel plots for detecting bias in meta-analysis: guidelines on choice of axis. J Clin. Epidemiol. 54:1046-1055, 2001.

489. Stewart, L.A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual paitent data from 12 randomized trials. Lancet 359:1011-1018, 2002.

490. Stupp, R. Methylguanine methyltransefrase testing in glioblastoma: when and how? J. Clin. Oncol. 25:1459-1460, 2007.

491. Stupp, R., Hegi, M.E., van den Bent, M.J., Mason, W.P., Weller, M., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G. Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. Oncologist. 11:165-180, 2006.

492. Stupp, R., Hegi, M.E., Gilbert, M.R., Chakravarti, A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. J Clin. Oncol. 25:4127-4136, 2007.

493. Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Bryes, A.A., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O. Radiotherapy plus concomitant and ajuvant temozolamode for glioblastoma. N. Engl. J. Med. 352:987-996, 2005.

494. Stupp, R., Reni, M., Gatta, G., Mazza, E., Vecht, C. Anaplastic astrocytoma in adults. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 63:72-80, 2007.

495. Supic, G., Kozomara, R., Brankovic-Magic, M., Jovic, N., Magic, Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. Oral Oncol. 45:1051-1057, 2009.

496. Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Nakamura, H., Hirano, H., Kuratsu, J., Kochi, M., Saya, H., Ushio, Y. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. J Neurosurg 95:651-659, 2001.

497. Taioli, E., Ragin, C., Wang, X.H., Chen, J., Langevin, S.M., Brown, A.R., Gollin, S.M., Garte, S., Sobol, R.W. Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. BMC Cancer 9:354, 2009.

498. Takagi, Y., Takahashi, M., Sanada, M., Ito, R., Yamaizumi, M., Sekiguchi, M. Roles of MGMT and MLH1 proteins in alkylation-induced apoptosis and mutagenesis. DNA Repair (Amst) 2:1135-1146, 2003.

499. Tanaka, S., Kobayahi, I., Utsuki, S., Oka, H., Fujii, K., Watanabe, T., Nagashima, T., Hori, T. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in gliomas by means of real-time quantitative RT-PCR and clinical response to nitrosoureas. Int. J. Cancer 103:67-72, 2003.

500. Tanaka, S., Oka, H., Fujii, K., Watanabe, K., Nagao, K., Kakimoto, A. Quantitation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene messenger RNA in gliomas by means of real-time RT-PCR and clinical response to nitrosoureas. Cell Mol Neurobiol. 25:1067-1071, 2005.

501. Tews, B., Felsberg, J., Hartmann, C., Kunitz, A., Hahn, M., Toedt, G., Neben, K., Hummerich, L., von, D.A., Reifenberger, G., Lichter, P. Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. Int. J Cancer 119:792-800, 2006.

502. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature 455:1061-1068, 2008.

503. Thiessen, B., Maguire, J.A., McNeil, K., Huntsman, D., Martin, M.A., Horsman, D. Loss of heterozygosity for loci on chromosome arms 1p and 10q in oligodendroglial tumors: relationship to outcome and chemosensitivity. J Neurooncol. 64:271-278, 2003.

504. Thomas, J.L., Spassky, N., Perez Villegas, E.M., Olivier, C., Cobos, I., Goujet-Zalc, C., Martínez, S., Zalc, B. Spatiotemporal development of oligodendrocytes in the embrionic brain. J. Neurosci. Res. 59:471-476, 2000.

505. Torii, K., Tsuyuguchi, N., Kawabe, J., Sunada, I., Hara, M., Shiomi, S. Correlation of amino-acid uptake using methionine PET and histological classifications in various gliomas. Ann. Nucl. Med. 19:677-683, 2005.

506. Tortosa, A., Viñolas, N., Villà, S., Verger, E., Gil, J.M., Brell, M., Caral Pons, J.J., Pujol, T., Acebes, J.J., Ribalta, T., Ferrer, I., Graus, F. Prognostic implication of clinical, radiologic, and pathologic features in patients with anaplastic gliomas. Cancer 97:1063-1071, 2003.

507. Turker, M.S. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. Oncogene 21:5388-5393, 2002.

508. Tzourio-Mazoyer, N., Josse, G., Crivello, F., Mazoyer, B. Interindividual variability in the hemispheric organization for speech. Neuroimage. 21:422-435, 2004.

509. Uccella, S., Cerutti, R., Placidi, C., Marchet, S., Carnevali, I., Bernasconi, B., Proserpio, I., Pinotti, G., Tibiletti, M.G., Furlan, D., Capella, C. MGMT methylation in diffuse large B-cell lymphoma: validation of quantitative methylation-specific PCR and comparison with MGMT protein expression. J Clin. Pathol. 62:715-723, 2009.

510. Ueda, S., Mineta, T., Nakahara, Y., Okamoto, H., Shiraishi, T., Tabuchi, K. Induction of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by dexamethasone in glioblastomas. J Neurosurg. 101:659-663, 2004.

511. Ueki, K., Nishikawa, R., Nakazato, Y., Hirose, T., Hirato, J., Funada, N., Fujimaki, T., Hojo, S., Kubo, O., Ide, T., Usui, M., Ochiai, C., Ito, S., Takahashi, H., Mukasa, A., Asai, A., Kirino, T. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EFRR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. Clin. Cancer Res. 8:196-201, 2002.

512. Vamvakas, E.C. Meta-analyses of studies of the diagnostic accuracy of laboratory tests: a review of the concepts and methods. Arch. Pathol. Lab Med. 122:675-686, 1998.

513. van Breemen, M.S., Wilms, E.B., Vecht, C.J. Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. Lancet Neurol. 6:421-430, 2007.

514. Van de Kelft, E. Molecular pathogenesis of astrocytoma and glioblastoma multiforme. Acta Neurochir. (Wien.) 139:589-599, 1997.

515. van den Bent, M., Chinot, O., Cairncross, J.G. Recent developments in the molecular characterization and treatment of oligodendroglial tumors. Neuro-Oncology 5:128-138, 2003.

516. van den Bent, M.J. Chemotherapy of oligodendroglial tumours: current developments. Forum (Genova.) 10:108-118, 2000.

517. van den Bent, M.J., Dubbink, H.J., Sanson, M., van der Lee-Haarloo CR, Hegi, M., Jeuken, J.W., Ibdaih, A., Bryes, A.A., Taphoorn, M.J., Frenay, M., Lacombe, D., Gorlia, T., Dinjens, W.N., Kros, J.M. MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. J Clin. Oncol. 27:5881-5886, 2009.

518. van den Bent, M.J. y Kros, J.M. Predictive and prognostic markers in neuro-oncology. J Neuropathol. Exp. Neurol. 66:1074-1081, 2007.

519. van den Bent, M.J., Looijenga, L.H.J., Langenberg, K., Dinjens, W., Gravely, W., Uytdewilligen, L., Sillevis Smitt, P.A., Jenkins, R.B., Kros, J.M. Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. Cancer 97:1276-1284, 2003.

520. van den Bent, M.J., Reni, M., Gatta, G., Vecht, C. Oligodendroglioma. Crit Rev. Oncol. Hematol. 66:262-272, 2008.

521. Van den Bruel, A., Cleemput, I., Aertgeerts, B., Ramaekers, D., Buntinx, F. The evaluation of diagnostic tests: evidence on technical and diagnostic accuracy, impact on patient outcome and cost-effectiveness is needed. J Clin. Epidemiol. 60:1116-1122, 2007.

522. Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.K., Wen, P.Y., Olson, J.J. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. CA Cancer J Clin. 60:166-193, 2010.

523. van Nifterik, K.A., van den Berg, J., Stalpers, L.J., Lafleur, M.V., Leenstra, S., Slotman, B.J., Hulsebos, T.J., Sminia, P. Differential radiosensitizing potential of temozolomide in MGMT promoter methylated glioblastoma multiforme cell lines. Int. J Radiat. Oncol. Biol. Phys. 69:1246-1253, 2007.

524. Virgili, G., Conti, A.A., Murro, V., Gensini, G.F., Gusinu, R. Systematic reviews of diagnostic test accuracy and the Cochrane collaboration. Intern. Emerg. Med., 2009.

525. Vlassenbroeck, I., Califice, S., Diserens, A.C., Migliavacca, E., Straub, J., Di Stefano, I., Moreau, F., Hamou, M.F., Renard, I., Delorenzi, M., Flamion, B., DiGuiseppi, J., Bierau, K.,

Hegi, M.E. Validation of real-time methylation-specific PCR to determine O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase gene promoter methylation in glioma. J Mol Diagn 10:332-337, 2008.

526. Voelter, V., Diserens, A.C., Moulin, A., Nagel, G., Yan, P., Migliavacca, E., Rimoldi, D., Hamou, M.F., Kaina, B., Leyvraz, S., Hegi, M.E. Infrequent promoter methylation of the MGMT gene in liver metastases from uveal melanoma. Int. J Cancer 123:1215-1218, 2008.

527. Vogelbaum, M.A., Berkey, B., Peereboom, D., Macdonald, D., Giannini, C., Suh, J.H., Jenkins, R., Herman, J., Brown, P., Blumenthal, D.T., Biggs, C., Schultz, C., Mehta, M. Phase II trial of preirradiation and concurrent temozolomide in patients with newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and mixed anaplastic oligoastrocytomas: RTOG BR0131. Neuro. Oncol. 11:167-175, 2009.

528. von Deimling, A., Reifenberger, G., Kros, J.M., Louis, D.N., Collins, V.P. Anaplastic oligoastrocytoma. En: Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D. and Cavenee, W.K. (Eds.) WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System, Lyon: International Agency for Research on Cancer, IARC Press, 2007, pp. 66-67.

529. Wager, M., Menei, P., Guilhot, J., Levillain, P., Michalak, S., Bataille, B., Blanc, J.L., Lapierre, F., Rigoard, P., Milin, S., Duthe, F., Bonneau, D., Larsen, C.J., Karayan-Tapon, L. Prognostic molecular markers with no impact on decision-making: the paradox of gliomas based on a prospective study. Br. J Cancer 98:1830-1838, 2008.

530. Wagner, L.M., McLendon, R.E., Yoon, K.J., Weiss, B.D., Billups, C.A., Danks, M.K. Targeting methylguanine-DNA methyltransferase in the treatment of neuroblastoma. Clin. Cancer Res. 13:5418-5425, 2007.

531. Walker, C., du Plessis, D.G., Fildes, D., Haylock, B., Husby, D., Jenkinson, M.D., Joyce, K.A., Broome, J., Kopitski, K., Prosser, J., Smith, T., Vinjamuri, S., Warnke, P.C. Correlation of molecular genetics with molecular and morphological imaging in gliomas with an oligodendroglial component. Clin. Cancer Res. 10:7182-7191, 2004.

532. Walker, C., du Plessis, D.G., Joyce, K.A., Fildes, D., Gee, A., Haylock, B., Husby, D., Smith, T., Broome, J., Warnke, P.C. Molecular pathology and clinical characteristics of oligodendroglial neoplasms. Ann. Neurol. 57:855-865, 2005.

533. Walker, C., du Plessis, D.G., Joyce, K.A., Machell, Y., Thomson-Hehir, J., Al Haddad, S.A., Broome, J.C., Warnke, P.C. Phenotype versus genotype in gliomas displaying inter- or intratumoral histological heterogeneity. Clin. Cancer Res. 9:4841-4851, 2003.

534. Walker, C., Haylock, B., Husby, D., Joyce, K.A., Fildes, D., Jenkinson, M.D., Smith, T., Broome, J., du Plessis, D.G., Warnke, P.C. Clinical use of genotype to predict chemosensitivity in oligodendroglial tumors. Neurology 66:1661-1667, 2006.

535. Watanabe, T., Katayama, Y., Komine, C., Yoshino, A., Ogino, A., Ohta, T., Fukushima, T. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course. Int. J. Cancer 113:581-587, 2005.

536. Watanabe, T., Katayama, Y., Yoshino, A., Yachi, K., Ohta, T., Ogino, A., Komine, C., Fukushima, T. Aberrant hypermethylation of p14ARF and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression. Brain Pathol. 17:5-10, 2007.

537. Watanabe, T., Nakamura, M., Kros, J.M., Burkhard, C., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. Phenotype versus genotype correlation in oligodendrogliomas and low-grade diffuse astrocytomas. Acta Neuropathol. 103:267-275, 2002.

538. Weaver, K.D., Grossman, S.A., Herman, J.G. Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma. Cancer Invest. 24:35-40, 2006.

539. Weiler, M., Hartmann, C., Wiewrodt, D., Herrlinger, U., Gorlia, T., Bahr, O., Meyermann, R., Bamberg, M., Tatagiba, M., von, D.A., Weller, M., Wick, W. Chemoradiotherapy of Newly Diagnosed Glioblastoma with Intensified Temozolomide. Int. J Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2009.

540. Weinstein, J.N. Pharmacogenomics-Teaching olg drugs new tricks. N. Engl. J. Med. 343:1408-1409, 2000.

541. Weller, M. Temozolomide and MGMT forever? Neuro. Oncol. 12:219-220, 2010.

542. Weller, M., Berger, H., Hartmann, C., Schramm, J., Westphal, M., Simon, M., Goldbrunner, R., Krex, D., Steinbach, J.P., Ostertag, C.B., Loeffler, M., Pietsch, T., von, D.A. Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker? Clin. Cancer Res. 13:6933-6937, 2007.

543. Weller, M., Felsberg, J., Hartmann, C., Berger, H., Steinbach, J.P., Schramm, J., Westphal, M., Schackert, G., Simon, M., Tonn, J.C., Heese, O., Krex, D., Nikkhah, G., Pietsch, T., Wiestler, O., Reifenberger, G., von, D.A., Loeffler, M. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the german glioma network. J Clin. Oncol. 27:5743-5750, 2009.

544. Weller, M., Schmidt, C., Roth, W., Dichgans, J. Chemotherapy of human malignant glioma: prevention of efficacy by dexamethasone? Neurology 48:1704-1709, 1997.

545. Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Bryes, A.A., van den Bent, M.J., Wick, W., Hegi, M.E. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? Nat. Rev. Neurol. 6:39-51, 2010.

546. Weswood, M.E., Whiting, P.F., Kleijnen, J. How does study quality affect the results of diagnostic meta-analysis? BMC Med. Res. Methodol. 5, 2005.

547. Whitehall, V.L., Walsh, M.D., Young, J., Leggett, B.A., Jass, J.R. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. Cancer Res. 61:827-830, 2001.

548. Whitmore, R.G., Krejza, J., Kapoor, G.S., Huse, J., Woo, J.H., Bloom, S., Lopinto, J., Wolf, R.L., Judy, K., Rosenfeld, M.R., Biegel, J.A., Melhem, E.R., O'Rourke, D.M. Prediction of oligodendroglial tumor subtype and grade using perfusion weighted magnetic resonance imaging. J Neurosurg. 107:600-609, 2007.

549. Whiting, P., Harbord, R., Kleijnen, J. No role for quality scores in systematic reviews of diagnostic accuracy studies. BMC Med. Res. Methodol. 5:19, 2005.

550. Whiting, P., Rutjes, A.W., Reitsma, J.B., Bossuyt, P.M., Kleijnen, J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. BMC. Med. Res. Methodol. 3:25, 2003.

551. Whiting, P.F., Weswood, M.E., Rutjes, A.W., Reitsma, J.B., Bossuyt, P.N., Kleijnen, J. Evaluation of QUADAS, a tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. BMC Med. Res. Methodol. 6:9, 2006.

552. Whittle, I.R., Pringle, A.M., Taylor, R. Effects of resective surgery for left-sided intracranial tumours on language function: a prospective study. Lancet 351:1014-1018, 1998.

553. Wick, A., Felsberg, J., Steinbach, J.P., Herrlinger, U., Platten, M., Blaschke, B., Meyermann, R., Reifenberger, G., Weller, M., Wick, W. Efficacy and tolerability of temozolomide in an alternating weekly regimen in patients with recurrent glioma. J Clin. Oncol. 25:3357-3361, 2007.

554. Wick, W., Hartmann, C., Engel, C., Stoffels, M., Felsberg, J., Stockhammer, F., Sabel, M.C., Koeppen, S., Ketter, R., Meyermann, R., Rapp, M., Meisner, C., Kortmann, R.D., Pietsch, T., Wiestler, O.D., Ernemann, U., Bamberg, M., Reifenberger, G., von, D.A., Weller, M. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. J Clin. Oncol. 27:5874-5880, 2009.

555. Wick, W., Stupp, R., Beule, A.C., Bromberg, J., Wick, A., Ernemann, U., Platten, M., Marosi, C., Mason, W.P., van den Bent, M., Weller, M., Rorden, C., Karnath, H.O. A novel tool to analyze MRI recurrence patterns in glioblastoma. Neuro. Oncol. 10:1019-1024, 2008.

556. Widschwendter, M. y Jones, P.A. The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. Clin. Cancer Res. 8:17-21, 2002.

557. Wiencke, J.K., Aldape, K., McMillan, A., Wiemels, J., Moghadassi, M., Miike, R., Kelsey, K.T., Patoka, J., Long, J., Wrensch, M. Molecular features of adult glioma assocaited with patient race/ethnicity, age, and polimorphism in O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 14:1774-1783, 2005.

558. Wojdacz, T.K., Dobrovic, A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. Nucleic Acids Res. 35:e41, 2007.

559. Wolf, P., Hu, Y.C., Doffek, K., Sidransky, D., Ahrendt, S.A. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer. Cancer Res. 61:8113-8117, 2001.

560. Wrensch, M., Rice, T., Miike, R., McMillan, A., Lamborn, K.R., Aldape, K., Prados, M.D. Diagnostic, treatment, and demographic factors influencing survival in a population-based study of adult glioma patients in the San Francisco Bay Area. Neuro-Oncology 8:12-26, 2006.

561. Wu, A., Aldape, K., Lang, F.F. High rate of deletion of chromosomes 1p and 19q in insular oligodendroglial tumors. J Neurooncol. 99:57-64, 2010.

562. Wu, P.F., Kuo, K.T., Kuo, L.T., Lin, Y.T., Lee, W.C., Lu, Y.S., Yang, C.H., Wu, R.M., Tu, Y.K., Tasi, J.C., Tseng, H.M., Tseng, S.H., Cheng, A.L., Lin, C.H. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase expression and prognostic value in brain metastases of lung cancers. Lung Cancer 68:484-490, 2010.

563. Yachi, K., Watanabe, T., Ohta, T., Fukushima, T., Yoshino, A., Ogino, A., Katayama, Y., Nagase, H. Relevance of MSP assay for the detection of MGMT promoter hypermethylation in glioblastomas. Int. J Oncol. 33:469-475, 2008.

564. Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., Bigner, D.D. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N. Engl. J Med. 360:765-773, 2009.

565. Yanagawa, N., Tamura, G., Oizumi, H., Kanauchi, N., Endoh, M., Sadahiro, M., Motoyama, T. Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. Lung Cancer 58:131-138, 2007.

566. Yang, S.H., Kim, Y.H., Kim, J.W., Park, C.K., Park, S.H., Jung, H.W. Methylation Status of the O6-Methylguanine-Deoxyribonucleic Acid Methyltransferase Gene Promoter in World Health Organization Grade III Gliomas. J Korean Neurosurg. Soc. 46:385-388, 2009.

567. Yin, D., Xie, D., Hofmann, W.K., Zhang, W., Asotra, K., Wong, R., Black, K.L., Koeffler, H.P. DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase: promoter hypermethylation associated with decreased expression and G:C to A:T mutations of p53 in brain tumors. Mol Carcinog. 36:23-31, 2003.

568. Yip, S., Iafrate, A.J., Louis, D.N. Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: a practical update on predictive markers. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 67:1-15, 2008.

569. Yoshimoto, K., Iwaki, T., Inamura, T., Fukui, M., Tahira, T., Hayashi, K. Multiplexed analysis of post-PCR fluorescence-labeled microsatellite alleles and statistical evaluation of their imbalance in brain tumors. Jpn. J. Cancer Res. 93:284-290, 2002.

570. Yu, J., Zhang, H., Gu, J., Lin, S., Li, J., Lu, W., Wang, Y., Zhu, J. Methylation profilrd of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. BMC Cancer 4:65-Comprobar, 2004.

571. Yuan, Q., Matsumoto, K., Nakabeppu, Y., Iwaki, T. A comparative immunohistochemistry of O6-Methylguanine-DNA methyltransferase and p53 in diffusely infiltrating astrocytomas. Neuropathology 23:203-209, 2003.

572. Yung, W.K., Prados, M.D., Yaya-Tur, R., Rosenfeld, S.S., Brada, M., Friedman, H.S., Albright, R., Olson, J., Chang, S.M., O'Neill, A.M., Friedman, A.H., Bruner, J., Yue, N., Dugan, M., Zaknoen, S., Levin, V.A. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain

Tumor Group [errata publicada en J Clin Oncol 1999 Nov;17(11):3693]. J. Clin. Oncol. 17:2762-2771, 1999.

573. Zaidi, N.H., Liu, L., Gerson, S.L. Quantitative immunohistochemical estimates of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase expression in normal and malignant human colon. Clin. Cancer Res. 2:577-584, 1996.

574. Zamora, J., Abraira, V., Muriel, A., Khan, K., Coomarasamy, A. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. BMC. Med. Res. Methodol. 6:31, 2006.

575. Zamora Romero, J., Plana, M.N., Abraira Santos, V. Estudios de evaluación de la validez de una prueba diagnóstica: revisión sistemática y metanálisis. Nefrologia 29:15-20, 2009.

576. Zlatescu, M.C., TehraniYazdi, A., Sasaki, H., Megyesi, J.F., Betensky, R.A., Louis, D.N., Cairncross, J.G. Tumor location and growth patter correlate with genetic signature in oligodendroglial neoplasms. Cancer Res. 61:6713-6715, 2001.

577. Zhang, D., Bai, Y., Wang, Y., Luo, J., Ge, Q., Qiao, Y., Jia, C., Lu, Z. Detailed methylation patterns and protein expression profiles of MGMT in colorectal carcinoma surgical margins. Clin. Biochem. 41:19-25, 2008.

578. Zhang, Y.J., Chen, Y., Ahsan, H., Lunn, R.M., Lee, P.H., Chen, C.J., Santella, R.M. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to aflatoxin B1-DNA adducts and p53 mutation in hepatocellular carcinoma. Int. J Cancer 103:440-444, 2003.

579. Zhang, L., Lu, W., Miao, X., Xing, D., Tan, W., Lin, D. Inactivation of DNA repair gene O6-Methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relation to p53 mutations in esophageal squamous cell carcinoma. Carcinogenesis 24:1039-1044, 2003.

580. Zhao, W., Soejima, H., Higashimoto, K., Nakagawachi, T., Urano, T., Kudo, S., Matsukura, S., Matsuo, S., Joh, K., Mukai, T. The essential role of histone H3 Lys9 di-

methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island. J Biochem. 137:431-440, 2005.

581. Zhu, A., Shaeffer, J., Leslie, S., Kolm, P., El-Mahdi, A.M. Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 34:809-815, 1996.

582. Zhukovskaya, N., Rydberg, B., Karran, P. Inactive O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in human cells. Nucleic Acids Res. 20:6081-6090, 1994.

583. Zou, X.P., Zhang, B., Zhang, X.Q., Chen, M., Cao, J., Liu, W.J. Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. Hum. Pathol. 40:1534-1542, 2009.

584. Zuo, C., Ai, L., Ratliff, P., Suen, J.Y., Hanna, E., Brent, T.P., Fan, C-Y. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase gene: Epigenetic silencing and prognostic values in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13:967-975, 2004.