

ORIGINAL

Estudio de las alteraciones genéticas del IDH1 y del VEGF en los tumores cerebrales

Study of IDH1 and VEGF genetic alterations in brain tumors

Gregorio Rodríguez-Boto

Servicio de Neurocirugía. Hospital Clínico San Carlos. Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

Correspondencia

Gregorio Rodríguez-Boto
Servicio de Neurocirugía.
Hospital Clínico San Carlos. Departamento de Cirugía
Avda. Dr. García Tapia 159. Portal D. 4ºB. · 28030 · Madrid
Tel: 649 840 902 · Fax: 917515778
e-mail: grboto@yahoo.es

Recibido: : 24 – X – 2013

Aceptado: 3 – XII – 2013

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.29.01.09

Resumen

Introducción: Múltiples marcadores moleculares se han relacionado recientemente con los tumores cerebrales. Este trabajo estudia la presencia de la mutación del gen de la enzima isocitrato dehidrogenasa 1 (IDH1) y del polimorfismo +936 C/T del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en los tumores cerebrales. Además, valora el impacto que estas alteraciones genéticas tienen en la supervivencia.

Material y método: La muestra estuvo constituida por 93 pacientes intervenidos en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, entre marzo de 2004 y noviembre de 2012. Como controles para el VEGF se tomaron 325 pacientes ambulatorios de Nefrología.

Resultados: La mutación del IDH1 se encontró en 12 pacientes (13,04%), 5 (45,45%) en gliomas benignos y 7 (14,38%) en gliomas malignos. La curva de supervivencia para IDH1 mostró una tendencia hacia un mejor pronóstico de los tumores que exhiben la mutación, con una p de 0,0731 y una Hazard Ratio de 0,35. El polimorfismo del VEGF se encontró en 20 pacientes (21,51%), siendo más frecuente en oligodendrogliomas, meningiomas y ependimomas, sin relación con la supervivencia. Respecto a los controles para VEGF, este polimorfismo se registró en un 23,38%. El estudio de casos y controles no demostró asociación con la supervivencia ni con el riesgo de desarrollar un tumor cerebral.

Conclusiones: La mutación en IDH1 es más frecuente en gliomas benignos, con una tendencia a mayor supervivencia de los pacientes que la portan. El polimorfismo +936 C/T del VEGF es más frecuente en tumores benignos aunque sin relación estadística con la supervivencia.

Palabras clave: Tumores cerebrales · Glioblastoma · Glioma · Isocitrato dehidrogenasa · VEGF

Abstract

Introduction: Multiple molecular markers have recently been related to brain tumors. This study evaluates the presence of gene mutation in isocitrate dehydrogenase enzyme (IDH1) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) +936 C/T polymorphism in brain tumors. The impact of these genetic alterations on overall survival was evaluated.

Material and Method: A sample of 93 patients operated at Hospital Clínico San Carlos, Madrid, between March 2004 and November 2012, were included. A total of 325 Nephrology outpatients were taken as controls for the VEGF study.

Results: IDH1 mutation was found in 12 patients (13.04%), 5 (45.45%) in benign gliomas and 7 (14.38%) in malignant gliomas. The survival curve for IDH1 showed a tendency towards a better prognosis of the tumors exhibited by the mutation, with a p 0.0731 and a Hazard Ratio 0.35. The VEGF +936 C/T polymorphism was found in 20 patients (21.51%), the most common being in oligodendrogliomas, meningiomas and ependymomas, and unrelated to survival. Regarding the controls for VEGF, this polymorphism was recorded in 23.38% of the patients. The case-control study did not show any association with survival or the risk of developing a brain tumor.

Conclusions: IDH1 mutation is more frequent in benign gliomas, with a greater survival trend in patients who carry it. The VEGF +936 C/T polymorphism is more common in benign tumors, although there is no statistic relation to survival.

Keywords: Brain tumors · Glioblastoma · Glioma · Isocitrate dehydrogenase · VEGF

Introducción

Los gliomas cerebrales representan el 50% de los tumores del Sistema Nervioso Central. La World Health Organization clasifica los gliomas en tres tipos: astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas. A los astrocitomas se les asigna cuatro grados (del I al IV, siendo el I benigno y el resto ordenados de menor a mayor malignidad) en base a celularidad, actividad mitótica, atipia nuclear, vascularización y necrosis; los oligodendrogliomas y ependimomas se clasifican en dos grados: bajo grado o II y anaplásicos o III¹.

Dos características propias de los gliomas son la progresión a variantes de mayor malignidad con el paso del tiempo y la invasión progresiva de estructuras centromediales encefálicas. Los glioblastomas multiformes (GBMs) o astrocitomas grado IV son los más agresivos y frecuentes de todos los gliomas, representando el 50%. Se clasifican en primarios, cuando no existe tumor de bajo grado previo, y secundarios, cuando evolucionan desde un astrocitoma de grado histológico menor. La supervivencia media de los GBMs es de 15 a 18 meses, aunque existe un 2-5% de supervivientes de larga duración, que viven más de 3 años².

Hoy en día se sabe que la neovasculogénesis y las alteraciones metabólicas de las células cancerosas conducen al crecimiento y autorrenovación de los gliomas y por tanto, a la progresión tumoral por falta de control de las mismas. Esto ha potenciado el estudio genético en los últimos años y la aparición de nuevos marcadores moleculares que puedan aportar información diagnóstica y pronóstica. Entre ellos se encuentra la mutación en el codón 132 (R132H) del gen de la enzima isocitrato dehidrogenasa 1 (IDH1) y el polimorfismo +936 C/T del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

Hasta el momento, los estudios demuestran la presencia de la mutación del IDH1 en un 70-80% de GBMs secundarios y un 10% de los GBMs primarios, asociándose en ambos casos a pacientes jóvenes y a una mayor supervivencia global²⁻⁵. Este aumento en la supervivencia también se ha demostrado para astrocitomas de grado III, con tasas de mutación del 64% y astrocitomas grado II, con tasas del 71-78%⁶⁻⁸. Los astrocitomas pilocíticos o grado I exhiben la mutación en un 0-2% de los casos, sin resultados concluyentes respecto a supervivencia^{7,9,10}. Los oligodendrogliomas con mutaciones del IDH1 manifiestan una mayor supervivencia post-recurrencia, aunque menor supervivencia sin recurrencia^{7,8}. En el caso de los ependimomas, ningún estudio ha encontrado mutaciones para IDH1.

En relación a VEGF, se han hecho pocos estudios en tumores cerebrales, aunque a día de hoy se cree que el polimorfismo +936 C/T se encuentra asociado a gliomas de bajo grado y supone un factor de riesgo de progre-

sión¹¹. Sin embargo, algunos estudios desechan la existencia de un impacto pronóstico para los GBMs¹².

El objetivo de este estudio es valorar si existe asociación entre la mutación IDH1 y el polimorfismo VEGF +936 C/T con los tipos histológicos y la supervivencia de los gliomas. En el caso de VEGF +936 C/T además se evaluará el riesgo de desarrollar un tumor cerebral mediante un estudio de casos y controles.

Material y Método

Sujetos de estudio

Se partió de una muestra de 93 pacientes con tumores cerebrales intervenidos quirúrgicamente en el servicio de Neurocirugía del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, entre marzo de 2004 y noviembre de 2012. Si bien se operaron más pacientes en dicho período de estudio, sólo se incluyeron aquéllos en los que fue posible realizar el estudio genético del tejido tumoral y de la sangre periférica. Aunque algunos pacientes recidivaron y se reintervinieron de sus tumores cerebrales, sólo se analizó la muestra tumoral procedente de la cirugía inicial.

La muestra control para el riesgo de tumor cerebral asociado a VEGF estuvo compuesta por 325 sujetos provenientes de las consultas externas de Nefrología, entre noviembre de 2009 y agosto de 2011 y en los que, por tanto, se había descartado la existencia de un tumor cerebral. A estos pacientes se les extrajo muestra de sangre periférica con el fin de tipificar la alteración genética. En todos los pacientes y controles se solicitó el consentimiento informado, según modelo aprobado por el Comité de Ética del Hospital y de acuerdo a las especificaciones que se establecen en la Declaración de Helsinki de 1975. Asimismo, el acceso a las historias clínicas y datos de los pacientes se realizó siguiendo los protocolos establecidos por el Hospital Clínico San Carlos para dicho propósito.

Variables

Las variables de estudio fueron: edad, sexo, fechas de nacimiento, de diagnóstico y de ingreso, datos de tomografía computerizada (TC) y resonancia magnética (RM), fecha de la cirugía, complicaciones de la cirugía, grado de resección, histología del tumor, tratamiento radio-quimioterápico, seguimiento clínico-radiológico hasta el fallecimiento o pérdida de contacto, frecuencia de mutaciones en el codón 132 (R132H) del gen IDH1 (en tejido tumoral) y de los alelos C y T en el gen VEGF (en sangre periférica). Se recogió además el estado general del paciente pre y post-tratamiento, en base a la escala *Karnofsky Performance Status* (KPS).

Con fines de análisis de resultados, se asumió que los astrocitomas grado I, oligodendrogliomas no anaplásicos y ependimomas no anaplásicos eran benignos, mientras que astrocitomas grados II a IV, oligodendrogliomas anaplásicos y ependimomas anaplásicos eran tumores malignos.

El tiempo de supervivencia fue calculado desde la fecha de cirugía hasta la fecha de fallecimiento, obtenida mediante consulta administrativa o consulta directa con los familiares del paciente. En caso de que el paciente no hubiera fallecido, se tomó como referencia la fecha de la última revisión en consultas externas.

Análisis de mutaciones

Tanto el DNA de tejido tumoral como el de sangre periférica fueron extraídos empleando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN® Hilden, Germany).

La presencia de mutación del gen IDH1 en tejido tumoral se analizó mediante PCR-RFLP usando la enzima de restricción Hsp92II (Promega® Madison, Wisconsin). La digestión se hizo en un volumen total de 20 µl durante 4 horas; los productos digeridos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. La amplificación del exón 4 del gen IDH1 se basó en la secuencia de primers IDH1-forward 5'-GGA TGC TGC AGA AGC TAT AA-3' e IDH1-reverse 5'-CAT GCA AAA TCA CAT TAT TGC C-3'¹³.

La detección del polimorfismo VEGF +936 C/T en sangre periférica se realizó mediante PCR a tiempo real con sondas TaqMan® MGB probe (Carlsbad, CA). La secuencia de los primers usados fueron VEGF-forward 5'-ACT CCG GCG GAA GCA TTC-3' y VEGF-reverse 5'-AGC AAG AAA AAT AAA ATG GCG AAT CCA-3'. También se emplearon dos probes: WT C Probe 5'-FAM-CAA GAG GGA CCG TGC TG-MGB-NFQ-3' y Var T Probe 5'-TET-AAG AGG GAC CAT GCT G-MGB-NFQ-3'¹⁴.

Con fines de análisis de resultados, tanto para IDH1 como para VEGF, se enfrentó el genotipo wild-type (wt) o no mutado al genotipo mutado. Este último comprendía tanto la variante heterocigota como la homocigota recesiva.

Método estadístico

La recogida de datos y el análisis estadístico se realizaron mediante el programa MSAccess 2007 (Microsoft Windows® Redmond, WA).

Las variables cuantitativas se resumieron con su media y rango o con su mediana y rango intercuartílico en caso de presentar asimetría o dispersión elevada. Las variables cualitativas se describieron a través de su frecuen-

cia absoluta y su frecuencia relativa. La asociación entre variables cualitativas se estudió a través del test de χ^2 o con la prueba exacta de Fisher en el caso de que las frecuencias esperadas fueran inferiores a 5. Se consideró que existía significación estadística con valores de p menores de 0,05.

Se utilizaron curvas de Kaplan-Meier para describir la supervivencia a lo largo del tiempo comparando los grupos en función de la presencia de la mutación con el estadístico de Breslow. También se calculó la Hazard Ratio (HR).

Resultados

Descriptivo de la muestra

La edad media de los pacientes fue de 54,8 años, abarcando desde los 2 a los 85 años. La mayor parte eran mujeres, un 62,4% (58 casos) y tan solo un 37,6% (35 casos) eran varones. Los tumores que se registraron fueron: 3 astrocitomas grado I (3,23%), 5 astrocitomas grado II (5,38%), 7 astrocitomas grado III (7,53%), 35 astrocitomas grado IV o GBMs (37,63%), 5 oligodendrogliomas (5,38%), 1 oligodendroglioma anaplásico (1,08%), 3 ependimomas (3,23%), 1 meduloblastoma (1,08%), 18 meningiomas (19,35%), 6 metástasis (6,45%), 2 adenomas hipofisarios (2,15%) y 7 pacientes con "otros tumores" (7,53%). Dentro del grupo de los 35 GBMs, 33 eran GBMs primarios y 2 GBMs secundarios.

Si agrupamos los tipos tumorales en base a los criterios de malignidad expuestos previamente en la sección de Material y Métodos, había 48 gliomas malignos, 8 tumores malignos no gliales (sarcoma meníngeo, metástasis y hemangiopericitoma), 11 gliomas benignos y 26 tumores benignos no gliales.

La mediana del tiempo de diagnóstico desde el comienzo de los síntomas fue de 15 días, variando desde el hallazgo casual hasta los 60 días. La mayoría de los pacientes mantenían un KPS mayor de 70 en el momento del diagnóstico (75 casos; 80,6%).

Con respecto a las características de los tumores observados, 80 eran supratentoriales (86,02%), 11 infratentoriales (11,83%) y 2 supra e infratentoriales (2,15%); 42 eran derechos (45,16%), 39 izquierdos (41,94%), 10 mediales (10,75%) y 2 bilaterales (2,15%). Respecto a su distribución espacial principal, había: 39 frontales (41,94%), 24 temporales (25,81%), 17 parietales (18,28%), 8 cerebelosos (8,6%), 2 en el ángulo pontocebeloso (2,15%), 2 en el quiasma óptico (2,15%) y 1 de localización intraventricular exclusiva (1,07%).

El tipo de resección más frecuente, a criterio del propio cirujano, fue la resección completa, en un 60,2% de los casos (56 pacientes), seguido de la resección subtotal

(31,2%; 29 sujetos) y de la biopsia (3,2%; 3 pacientes). En 5 pacientes no se pudo determinar el tipo de cirugía. Hubo complicaciones en 20 pacientes (21,5%), de los cuales 18 presentaron deterioro neurológico debido a hematoma y/o edema cerebral, mientras que los otros 2 pacientes desarrollaron un hematoma postquirúrgico sin deterioro neurológico. Ninguno de estos pacientes fue reintervenido como consecuencia de estas complicaciones y sólo dos de ellos fallecieron en los primeros diez días tras la cirugía.

Tan sólo a 55 pacientes (59,14%) se les hizo una RM craneal dentro de los dos primeros días post-operatorios con el fin de valorar el grado de resección practicado, comprobándose que la resección fue completa en 23 pacientes (41,82%), subtotal en 31 casos (56,36%) y que sólo se tomó biopsia en 1 paciente (1,82%).

A 42 pacientes se les dio radioterapia (RT), de los cuales, 26 siguieron un protocolo de RT estereotáxica (61,9%) y 16 se sometieron a RT holocraneal (38,1%). De los 42 pacientes que recibieron RT, sólo 32 siguieron tratamiento con quimioterapia (QT), mientras que 2 pacientes fueron tratados directamente con QT sin RT previa. De este modo, un total de 34 pacientes recibieron QT, la mayoría (28 sujetos; 82,35%) con temozolomida. Un 75,3% de los casos (70 pacientes) mantuvieron un KPS post-tratamiento inmediato (post-quirúrgico o post-RT/QT) mayor de 70.

Con respecto a la recidiva tumoral, sólo 15 pacientes (16,13%) la presentaron, de los cuales, 9 progresaron en su enfermedad después de la reaparición del tumor (60%). Aquellos que, sin tener recidiva, progresaron en tamaño desde una cirugía con resección subtotal, sumaron un total de 26 (27,96%). En conjunto, 14 pacientes fueron reintervenidos, 7 por recidiva sin modificarse la anatomía patológica de los mismos y los otros 7 con progresión desde una resección subtotal, mostrando un mayor grado histológico de malignidad en dos astrocitomas, un astrocitoma de grado III que se convirtió en GBM y un astrocitoma grado II que pasó a ser de grado III.

Fallecieron 39 pacientes. De ellos, 36 casos (92,31%) fueron por causa neurológica, distribuyéndose su anatomía patológica como sigue: 24 GBMs, 6 astrocitomas grado III, 1 astrocitoma grado II, 1 meningioma, 2 metástasis, 1 adenoma hipofisario y 1 del grupo de "otros tumores". Los 3 pacientes restantes (7,69%) fallecieron por causas sistémicas: 2 GBMs y 1 metástasis.

El tiempo libre de enfermedad o *Progression-free survival* (PFS) se calculó desde el momento de la cirugía hasta la fecha de recidiva, de progresión, de muerte o de última revisión en consultas externas, en su defecto. Se obtuvo una mediana de 297 días, con un rango intercuartílico de 98 a 964 días.

Algunas de estas características descriptivas se resumen en la **Tabla I**.

Las características de los 325 controles fueron las siguientes: una media de edad de 55,5 años, con un rango que iba desde los 21 a los 82 años y una distribución por sexo de 213 hombres (65,54%) y 112 mujeres (34,46%).

Análisis de supervivencia para IDH1 mutado

La mutación del IDH1 se encontró en 12 pacientes (13,04%), no pudiéndose determinar en un caso de meningioma por muestra insuficiente de tejido. En todos los casos la mutación fue heterocigota. La distribución de mutación por tipo tumoral fue: 1 astrocitoma grado II, 3

Tabla I: Principales características clínicas de los pacientes. N=93.

Edad (años)*	54,8 (2-85)
Sexo	n (%)
Mujer	58 (62,4)
Varón	35 (37,6)
Tiempo evolución diagnóstico (días)**	15 (0-60)
KPS preoperatorio	n (%)
≤70	18 (19,4)
>70	75 (80,6)
Tipo de resección tumoral	n (%)
Completa	56 (60,2)
Subtotal	29 (31,2)
Biopsia	3 (3,2)
Desconocido	5 (5,4)
Complicaciones quirúrgicas	n (%)
Sí	20 (21,5)
No	73 (78,5)
KPS post-tratamiento¹	n (%)
≤70	23 (24,7)
>70	70 (75,3)
PFS² (días)**	297 (98-964)

* media (rango)

** mediana (rango intercuartílico)

¹ Postquirúrgico o post-RT/QT.

² Progression-free survival.

astrocitomas grado III, 2 GBMs, 5 oligodendrogliomas y 1 oligodendroglioma anaplásico. No se encontró mutación en astrocitomas de grado I, endimomas ni en tumores no gliales. Estos datos se muestran en la **Tabla II**.

Cuando agrupamos los tumores en base a su malignidad, encontramos que entre los gliomas malignos, 7 presentaron mutaciones del IDH1 (14,38%), mientras que 41 no presentaban mutación (85,42%). De entre los gliomas benignos, 5 presentaban mutación (45,45%) y 6 tenían IDH1-wt (54,55%). La asociación mostró una p de 0,036 **Tabla III**.

Si analizamos la supervivencia, entre los pacientes con IDH1 mutado, 9 sobrevivieron (75%) y sólo 3 fallecieron

Tabla II: Distribución de las mutaciones según el tipo histológico.

Anatomía Patológica	n	%	IDH1 mutado*		Polimorfismo +936 C/T VEGF*	
			n	%	n	%
Astrocitoma grado I	3	3,23	0	0,00	0	0,00
Astrocitoma grado II	5	5,38	1	20,00	1	20,00
Astrocitoma grado III	7	7,53	3	42,86	1	14,29
GBMs	35	37,63	2	5,71	5	14,29
Oligodendroglioma	5	5,38	5	100,00	3	60,00
Oligodendroglioma anaplásico	1	1,08	1	100,00	1	100,00
Ependimoma	3	3,23	0	0,00	1	33,33
Meduloblastoma	1	1,08	0	0,00	0	0,00
Meningioma	18	19,35	0	0,00	6	33,33
Metástasis	6	6,45	0	0,00	1	16,67
Adenoma hipofisario	2	2,15	0	0,00	1	50,00
Otros	7	7,53	0	0,00	0	0,00
Total	93	100,00	12	13,04	20	21,51

* Contienen la variante heterocigota para IDH1 y las variantes CT (heterocigota) y TT (homocigota recesiva) para VEGF.

(25%), mientras que en el grupo de IDH1-wt, 45 vivían al cierre de la base de datos (56,25%) y 35 habían fallecido (43,75%); con una *p* de 0,219. De entre los gliomas malignos, fallecieron 3 pacientes (42,86%) para IDH1 mutado y 30 (73,17%) para IDH1-wt, con una *p* de 0,183. Todos los pacientes con gliomas benignos seguían vivos hasta el momento de cierre de la base de datos (Tabla IV). La curva de supervivencia para IDH1 se muestra en la Fig.1A con una *p* de 0,0731, no resultando estadísticamente significativa aunque con cierta tendencia hacia una mayor supervivencia en el grupo de IDH1 mutado. La HR de esta curva mostró un valor de 0,35, con un intervalo de confianza de 0,11-1,15 y una *p* de 0,083.

Análisis de supervivencia para polimorfismo +936 C/T VEGF

El polimorfismo +936 C/T del VEGF se encontró en sangre periférica en 20 pacientes (21,51%): 17 casos (18,28%) presentaban la variante heterocigota o CT y 3 pacientes (3,23%) la variante homocigota recesiva o TT. Por tanto, el 78,49% (73 pacientes) tenían un VEGF-wt (no polimórfico o CC). Por tipo tumoral, la distribución de los 20 pacientes que presentaban el polimorfismo fue la siguiente: 1 astrocitoma grado II, 1 astrocitoma grado III, 5 GBMs, 3 oligodendrogliomas, 1 oligodendroglioma anaplásico, 1 ependimoma, 6 meningiomas, 1 metástasis y 1 adenoma hipofisario. Estos datos se reflejan en la Tabla II.

Si agrupamos los tumores según su malignidad, los gliomas malignos presentaron el polimorfismo en un 16,67% (8 pacientes) y los tumores malignos no gliales, en un 12,5% (1 paciente); los gliomas benignos mostraron el polimorfismo en un 36,36% (4 pacientes) y los tumores benignos no gliales, en un 26,92% (7 pacientes). La asociación mostró una *p* de 0,401 (Tabla III).

Fig. 1: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier).

- A. Curva de supervivencia para IDH1, mostrando en color azul la supervivencia en meses para la variante mutada y en rojo para la variante wild-type.
- B. Curva de supervivencia para VEGF: en color azul la supervivencia en meses para las variantes heterocigota (CT) y homocigota (TT) del polimorfismo +936 y en rojo, la supervivencia para la variante wild-type o CC.

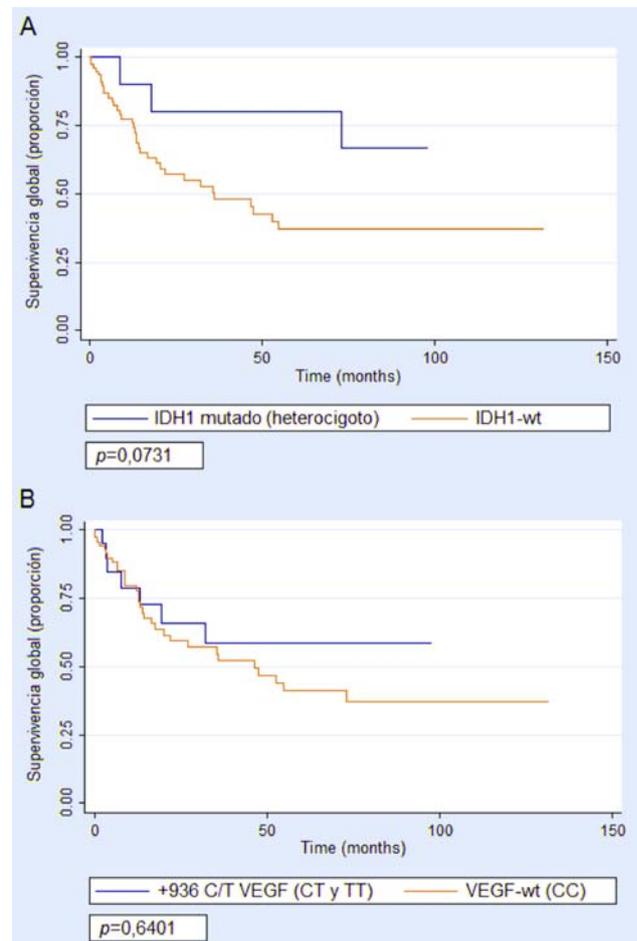


Tabla III: Distribución de mutaciones en función de la malignidad.

	N	IDH1 mutada*	Polimorfismo +936 C/T VEGF*
Gliomas malignos	48	7 (14,58)	8 (16,67)
Tumores malignos no gliales	8	0	1 (12,50)
Gliomas benignos	11	5 (45,45)	4 (36,36)
Tumores benignos no gliales	26	0	7 (26,92)
Total	93	12 (20,34)	20 (21,51)

* n (%)

Tabla IV: Análisis de supervivencia en base a la malignidad.

	N	Exitus IDH1 mutado*	Exitus IDH1-wt**	Exitus Polimorfismo +936 C/T VEGF*	Exitus VEGF-wt**
Gliomas malignos	48	3/7	30/41	5/8	28/40
Tumores malignos no gliales	8	-	4/8	1/1	3/7
Gliomas benignos	11	0/5	0/6	0/4	0/7
Tumores benignos no gliales	26	-	1/26	1/7	0/19
Total	93	3/12	35/81	7/20	31/73

* Fallecidos/total de mutados

** Fallecidos/total de no mutados

En base a la supervivencia, seguían vivos al cierre de la base de datos 13 pacientes (65%) de entre los que presentaban el polimorfismo y 42 (57,53%) de los que no lo mostraron, con una p de 0,547. De los gliomas malignos, fallecieron 5 pacientes (62,5%) de los que presentaban el polimorfismo y 28 (70%) de los que no lo tenían, con una p de 0,692. De aquellos pacientes con tumores no gliales con características de malignidad, falleció 1 (100%) de los que presentaba el polimorfismo y 3 (42,86%) de los que no lo presentaban. Los pacientes con tumores benignos, gliales y no gliales, seguían con vida en el momento del cierre de la base de datos, a excepción de uno de los 7 pacientes del grupo de tumores benignos no gliales con polimorfismo presente (14,29%) (Tabla IV). La curva de supervivencia para VEGF se muestra en la Fig.1B con una p de 0,6401. Esta curva presentó una HR de 0,69, con un intervalo de confianza de 0,30-1,57 y una p de 0,377.

Estudio de casos y controles para VEGF

El polimorfismo +936 C/T VEGF en los 325 controles estuvo presente en 63 pacientes (19,38%) en heterocigosis y en 13 pacientes (4%) en homocigosis recesiva (4%) sumando un total de 76 pacientes con polimorfismo (23,38%) frente a 20 pacientes entre los casos (21,51%), lo que hace que la asociación muestre una p de 0,704.

También se enfrentaron los resultados entre tumores malignos y tumores benignos/controles, demostrándose una presencia de polimorfismo en 9 (16,07%) de los 56 pacientes con tumores malignos y en 87 (24,03%) de los 362 pacientes con tumores benignos/controles, teniendo la asociación una p de 0,187.

En el total de casos y controles, la frecuencia absoluta del polimorfismo fue del 22,97% (96 pacientes), mientras que el 77,03% restante (322 pacientes) no presentaba ninguna forma de polimorfismo del VEGF. Al cierre de la base de datos, seguían vivos 89 de los pacientes con polimorfismo (92,71%) y 291 de los que no lo presentaban (90,37%), con una p de 0,485.

Discusión

IDH1 y tumores cerebrales

El gen de la IDH1 dependiente de NADP⁺ se encuentra en el cromosoma 2p33.3 y tiene su actividad en el citoplasma y los peroxisomas de las células. Las mutaciones que acontecen en este gen son normalmente heterocigotas y en la mayor parte de los casos consisten en el reemplazo de arginina por histidina en el residuo p.R132H de la proteína; lo más frecuente es encontrar una mutación c.395G>A (93%)⁴. La enzima IDH1-wt cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato en alfa-cetoglutarato, reduciendo NADP⁺ a NADPH. El NADPH es esencial para la regeneración de glutatión reducido, importante en la protección de las células frente al daño oxidativo¹. La enzima IDH1 mutada cataliza la reducción del alfa-cetoglutarato a R2-hidroxiglutarato (R2-HG), dependiente de NADP, lo cual provoca una disminución de los niveles de prolil oxidasas y promueve la acumulación del factor inducible de hipoxia. Existe pues, una acumulación de R2-HG que será clave en los procesos patológicos asociados a la mutación^{4,15-17}.

Sanson et al.¹⁶ fueron unos de los primeros en analizar la presencia de mutación del IDH1 según el tipo histológico,

encontrándolo por orden de frecuencia de mayor a menor en astrocitomas grado II, grado III y GBMs primarios, con unos resultados similares a los que dos años más tarde registraron Shibahara et al.⁶ en su investigación. Ambos consideraron que la presencia de mutaciones en el IDH1 suponía un factor independiente de pronóstico favorable, hipótesis que fue rechazada por Ichimura et al.¹⁸ y por Juratli et al.¹⁹, que comenzaron a considerar factores como la cirugía o el tratamiento con RT/QT a la hora de evaluar la supervivencia de estos pacientes.

Todos los autores^{4,10,19-22} coinciden en que, dentro del subtipo histológico de GBMs, las mutaciones en IDH1 son más frecuentes en GBMs secundarios y en pacientes más jóvenes. Nuestro estudio es consistente con estas afirmaciones, si bien sólo analizamos 2 GBMs secundarios mostrando uno de ellos la mutación, frente a 33 GBMs primarios, de los que sólo uno mostró la mutación. Aunque no está reflejado en el apartado de Resultados, la edad media de los pacientes portadores de gliomas con IDH1 mutado fue de 54,1 años vs 58,4 años de los pacientes afectados de gliomas con IDH1-wt.

En base a la supervivencia, cabe destacar los estudios de Mellai et al.⁴ y Takano et al.⁷, que coincidían en que la supervivencia de gliomas grado II, III y GBMs es mayor en aquellos pacientes con IDH1 mutada. No obstante, Mellai et al.⁴ relacionaron esta mayor supervivencia de los gliomas grados II y III con la menor edad de los pacientes al diagnóstico. Además, estos últimos autores analizaron otros tipos tumorales, no encontrando mutaciones en ninguno de ellos. En nuestro trabajo obtuvimos resultados concordantes a estos estudios: sólo existieron mutaciones de IDH1 en gliomas, afectando al 100% de oligodendrogliomas anaplásicos y no anaplásicos y por orden de frecuencia, a astrocitomas grado III, grado II y GBMs. No se encontraron mutaciones en astrocitomas grado I ni en ependimomas. La curva de supervivencia global muestra una tendencia hacia mayor supervivencia para aquellos gliomas que presentan mutación, si bien el tamaño muestral no es suficiente para que exista significación estadística ($p=0,0731$). El valor de la HR (0,35) se traduce en que, si bien la presencia de mutación se perfila como un factor protector frente a mortalidad, no resulta estadísticamente significativo.

Respecto al análisis de supervivencia para IDH1, nuestros resultados muestran una mayor prevalencia de IDH1 mutada en gliomas benignos ($p=0,036$). No obstante, este hallazgo no está relacionado con una menor mortalidad frente al IDH1-wt.

Juratli et al.¹⁹, Weller et al.¹⁷ y Yan et al.¹⁰ sugirieron que la mutación del IDH1 podría ocurrir en etapas tempranas de la formación de los gliomas y conduciría a la progresión del tumor hacia GBM. Por su parte, Hartmann et al.^{22,23} han supuesto que los GBMs primarios en realidad son GBMs secundarios en los que no se ha encontrado evidencia

histológica ni radiológica de evolución desde un glioma menos maligno. Ambas hipótesis resultan de gran interés en el conocimiento de la evolución de los gliomas, pudiendo servir en un futuro a intervenciones para frenar la misma.

VEGF y tumores cerebrales

El gen de VEGF se encuentra en el cromosoma 6p12 y consta de 8 exones que se recombinan para formar polimorfismos, como el +936 C/T, que condiciona un incremento de la producción de VEGF²⁴. Podemos encontrar este polimorfismo en diversos tumores, destacando los meningiomas y gliomas. VEGF es un factor clave en angiogénesis, progresión de tumores malignos, incremento de la permeabilidad vascular e hipercoagulabilidad. Ejerce su efecto a través del receptor VEGFR2, que juega un papel fundamental en el desarrollo, pronóstico y respuesta a terapia adyuvante del GBM¹².

Existen pocos estudios que asocien los tumores cerebrales con el polimorfismo del VEGF. Quon et al.¹¹ establecieron esta relación con oligodendrogliomas, especialmente los de grado III, en los que la presencia de esta alteración suponía un mayor riesgo para progresión tumoral y mal pronóstico. En nuestro estudio, el polimorfismo +936 C/T se asoció a tumores oligodendrogliales, estando presente en un 100% de los oligodendrogliomas anaplásicos y en un 60% de oligodendrogliomas no anaplásicos, siguiéndole en frecuencia meningiomas y ependimomas. Respecto a los ependimomas, esta asociación también fue demostrada por Korshunov et al.²⁵. Podemos inferir, por tanto, que las alteraciones en el +936 C/T VEGF son más frecuentes en tumores benignos. De hecho, si comparamos gliomas benignos con malignos, obtenemos una presencia del polimorfismo en un 36,36 vs 16,67% respectivamente, aunque el tamaño muestral no es suficiente como para que la diferencia resulte estadísticamente significativa.

Sjöström et al.¹² centraron la atención de su estudio en los GBMs, concluyendo que las variaciones polimórficas del VEGF no tuvieron impacto pronóstico en estos tumores, a diferencia de las variaciones en VEGFR2, su receptor. Nuestros datos son concordantes con esta investigación, ya que no se ha encontrado significación estadística para la supervivencia asociada a la presencia del polimorfismo, si bien la mortalidad es ligeramente mayor en aquellos tumores que no lo presentan, en términos absolutos (65 vs 57,53%). En nuestro trabajo, la supervivencia global de los pacientes con polimorfismo tampoco se encuentra relacionada con el tipo histológico.

Por último, enfrentando pacientes con tumores cerebrales a la población general mediante el estudio de casos y controles, como se hizo en el presente estudio, cabe destacar que no se ha encontrado asociación entre el polimorfismo del VEGF y el riesgo de desarrollar

un tumor cerebral. Tampoco se ha encontrado relación entre la presencia de polimorfismo y la supervivencia.

Conclusiones

La mutación de IDH1 es más frecuente en gliomas benignos, siendo los oligodendrogliomas el tipo histológico con el que más se relacionan y no encontrándose en ningún tumor de estirpe no glial. Con respecto a su asociación con GBMs, son más frecuentes en GBMs secundarios y afectan a pacientes más jóvenes. Además, existe cierta tendencia hacia una mayor supervivencia de los pacientes portadores de gliomas que expresan esta mutación.

El polimorfismo +936 C/T del VEGF es más frecuente en tumores oligodendrogliales y en general, en tumores benignos. No se ha encontrado relación entre la presencia de polimorfismo, la supervivencia o el riesgo de padecer un tumor cerebral.

Agradecimientos

Al Dr. Zimman Mansfeld, neurocirujano del Hospital Clínico San Carlos de Madrid; a la Dra. Maestro de las

Casas y su equipo de la Unidad de Genómica del Servicio de Análisis Clínicos (Hospital Clínico San Carlos de Madrid) y a Náyade del Prado, de la Unidad de Metodología de la Investigación y Epidemiología Clínica del Servicio de Medicina Preventiva (Hospital Clínico San Carlos de Madrid).

Conflicto de intereses

No hay conflicto de intereses que declarar. Los procedimientos seguidos fueron aprobados por la Comisión Ética del Hospital Clínico San Carlos, de acuerdo con la declaración de Helsinki.

Proyecto de investigación FIS, expediente nº PI11/01340, titulado: "Estudio pronóstico de las alteraciones genéticas del IDH1 y VEGF en los tumores cerebrales". 2011. Investigador principal: Gregorio Rodríguez Boto.

Proyecto enmarcado en una Beca de colaboración Curso 2012/2013, en el Departamento de Cirugía de la Universidad Complutense de Madrid, concedida a Doña Lucía Requejo García por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Bibliografía

- Ducray F, El Hallani S, Idbaih A. Diagnostic and prognostic markers in gliomas. *Curr Opin Oncol* 2009; 21:537-42.
- Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol* 2012; 108:11-27.
- Carrillo JA, Lai A, Nghiemphu PL, Kim HJ, Phillips HS, Kharbanda S, et al. Relationship between tumor enhancement, edema, IDH1 mutational status, MGMT promoter methylation, and survival in glioblastoma. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33:1349-55.
- Mellai M, Piazza A, Caldera V, Monzeglio O, Cassoni P, Valente G, et al. IDH1 and IDH2 mutations, immunohistochemistry and associations in a series of brain tumors. *J Neurooncol* 2011; 105:345-57.
- Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network *J Clin Oncol* 2009; 27:5743-50.
- Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, et al. IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas. *Int J Clin Oncol* 2012; 17:551-61.
- Takano S, Kato Y, Yamamoto T, Kaneko MK, Ishikawa E, Tsujimoto Y, et al. Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53, and intermexin as prognostic factors of glial tumors. *J Neurooncol* 2012; 108:361-73.
- Thon N, Eigenbrod S, Kreth S, Lutz J, Tonn JC, Kretschmar H, et al. IDH1 mutations in grade II astrocytomas are associated with unfavorable progression-free survival and prolonged postrecurrence survival. *Cancer* 2012; 118:452-60.
- Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Kumabe T, Tominaga T. New insights into glioma classification based on isocitrate dehydrogenase 1 and 2 gene status. *Brain Tumor Pathol* 2011; 28:203-8.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360:765-73.
- Quon H, Hasbini A, Cougnard J, Djafari L, Lacroix C, Abdulkarim B. Assessment of tumor angiogenesis as a prognostic factor of survival in patients with oligodendroglioma. *J Neurooncol* 2010; 96:277-85.
- Sjöström S, Wibom C, Andersson U, Brännström T, Broholm H, Johansen C, et al. Genetic variations in VEGF and VEGFR2 and glioblastoma outcome. *J Neurooncol* 2011; 104:523-7.
- Rocquain J, Carbucaia N, Trouplin V, Raynaud S, Murati A, Nezri M, et al. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer* 2010; 10:401.
- Schneider BP, Radovich M, Sledge GW, Robarge JD, Li L, Stornio AM, et al. Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 111:157-63.

15. Hodges TR, Choi BD, Bigner DD, Yan H, Sampson JH. Isocitrate dehydrogenase 1: what it means to the neurosurgeon. *J Neurosurg* 2013 Apr 12. [Epub ahead of print].
16. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 2009; 27:4150-4.
17. Weller M, Wick W, von Deimling A. Isocitrate dehydrogenase mutations: a challenge to traditional views on the genesis and malignant progression of gliomas. *Glia* 2011; 59:1200-4.
18. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DT, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 2009; 11:341-7.
19. Juratli TA, Kirsch M, Robel K, Soucek S, Geiger K, von Kummer R, et al. IDH mutations as an early and consistent marker in low-grade astrocytomas WHO grade II and their consecutive secondary high-grade gliomas. *J Neurooncol* 2012; 108:403-10.
20. Birner P, Toumangelova-Uzeir K, Natchev S, Guentchev M. Expression of mutated isocitrate dehydrogenase-1 in gliomas is associated with p53 and EGFR expression. *Folia Neuropathol* 2011; 49:88-93.
21. Ducray F, Idbaih A, Wang XW, Cheneau C, Labussiere M, Sanson M. Predictive and prognostic factors for gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011; 11:781-9.
22. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol* 2010; 120:707-18.
23. Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, Schramm J, Schnell O, Seidel C, et al. Glioma Network. Molecular markers in low-grade gliomas: predictive or prognostic? *Clin Cancer Res* 2011; 17:4588-99.
24. Li R, Zhao Y, Fan W, Chen H, Chen Y, Liu Y, et al. Possible association between polymorphisms of human vascular endothelial growth factor A gene and susceptibility to glioma in a Chinese population. *Int J Cancer* 2011; 128:166-75.
25. Korshunov A, Golanov A, Timirgazy V. Immunohistochemical markers for prognosis of ependymal neoplasms. *J Neurooncol* 2002; 58:255-70.