



Radioterapia, quimioterapia y gliomas. Decisiones basadas en marcadores de la metilación e inmunohistoquímica

Arroyo-Mayorga G,¹ Arroyo-del Castillo JG,² Zazueta-López IB³

¹ Tte. Cor. M.C., Maestro en Ciencias Médicas, neurocirujano, Hospital Central Militar.

² Médico, profesor adjunto de la materia de cirugía, Universidad Lasalle, Ciudad de México.

³ Médico interno, Hospital Central Militar, Ciudad de México.

Resumen

Los astrocitomas o gliomas cerebrales son los tumores intraxiales más comunes. En México, la incidencia reportada de tumores primarios del sistema nervioso central es de 2.3% de todas las neoplasias. En el tratamiento de los gliomas surge la necesidad de determinar qué paciente es susceptible de radioterapia o quimioterapia, o ambas. Existen marcadores genéticos para la mayor parte de los tipos de tumores. ¿Cuál o cuáles de los marcadores genéticos pueden ser útiles en la clínica para apoyar las decisiones de tratamiento? Se describen los marcadores útiles disponibles para el abordaje y tratamiento de este grupo de pacientes. En el caso del glioblastoma se observó alteración del promotor de metilación del ADN en un patrón denominado fenotipo metilador de la isla CpG-glioma. La resonancia magnética con espectroscopia con piruvato hiperpolarizado hace diferencia entre la persistencia de la enfermedad *versus* los efectos mediatos de la radioterapia, así como de la respuesta inmediata a la temozolamida. Se propone la utilización de estos medios de diagnóstico para optimizar el tratamiento de los pacientes.

PALABRAS CLAVE: gliomas, glioblastoma, metilación IDH-1, RMN hiperpolarizada.

Radiotherapy, chemotherapy and gliomas. Decisions supported by methylation markers and immunohistochemical analysis

Abstract

Astrocytomas or brain gliomas are the most common type of intra-axial tumors. In Mexico they account for 2.3% of primary central nervous system neoplasms. During the management of these tumors it is frequently a need to determine which cases are candidates to radiotherapy, chemotherapy or both. Genetic markers for the vast majority of tumors exist, some are useful to guide their treatment. Description of the available markers that help reach and guide the treatment these patients is made. DNA methylation promoter in a CpG island methylator phenotype was found in glioblastomas. Magnetic resonance spectroscopic imaging with hyperpolarized pyruvate highlight the difference between tumor's persistence and radiotherapy effects, as well as the immediate response to temozolamide. The use of these techniques is proposed to optimize the therapy for these patients.

KEY WORDS: Gliomas; Glioblastoma; IDH-1 metilation; Hyperpolarized IRM

Recibido: 30 de marzo 2017.

Aceptado: 11 de abril 2017.

Correspondencia

Tte. Cor. M.C. Gerardo Arroyo Mayorga
gerardo43462@gmail.com

ANTECEDENTES

Los astrocitomas o gliomas cerebrales son los tumores intraaxiales más comunes, la incidencia en Estados Unidos es de 12,000 nuevos casos por año. Las estadísticas en México no son detalladas en lo que respecta a este tipo de tumores. Hasta 2008 la incidencia reportada de tumores primarios del sistema nervioso central fue de 2.3% de los casos de neoplasias.

En el mundo, la incidencia anual de gliomas se calcula en 1.5 a 1.8 por cada 100,000 habitantes, lo que representa 1.9% de las neoplasias malignas.¹

A lo largo de la historia han existido diferentes maneras de clasificar a los gliomas, la más aceptada hoy día es la de la OMS, que lo divide en grupos del I al IV. Los de grado I y II son benignos y los III y IV malignos.

Los principales factores pronóstico señalados en estudios previos son: grado histológico, edad y estado funcional. La supervivencia a cinco años es de 27% para el astrocitoma grado II y menor de 5% a cinco años para el grado IV (glioblastoma).

En México, el tratamiento consiste en la cirugía con resección, limitada o parcial la mayor parte de las veces y, dependiendo de la localización del tumor, seguida de quimioterapia, sobre todo con temozolamida y radioterapia. Este tratamiento multimodal es de alto costo para los pacientes y las instituciones de salud, por lo que en muchas ocasiones los pacientes solo reciben una parte del tratamiento, casi siempre radioterapia

Problema

En la evolución de los gliomas cerebrales y su clínica con frecuencia surge la necesidad de determinar qué paciente es apto para radioterapia o

quimioterapia, o ambas, porque es una pregunta que hace la familia y también el médico responsable del paciente, cuestionamiento que debe interesar a los profesionales de la salud en nuestro país por el costo que representa dar tratamiento a un paciente que, con frecuencia, no reacciona favorablemente. Sobre todo si se toma en cuenta que un buen porcentaje de pacientes son jóvenes y que este grupo tiene mejor pronóstico que los ancianos; sin embargo, los efectos de la radioterapia pueden hacer que su resultado funcional final sea igual de deletéreo que la misma enfermedad. Lo anterior se debe a la heterogeneidad molecular del glioblastoma multiforme, además de que existe una frecuencia mutacional estadísticamente significativa entre jóvenes y ancianos de 0.88 en los primeros y de 1.39 en los segundos.²

Es, por lo tanto, imprescindible tener a la mano las herramientas de laboratorio que ayuden a responder las dudas en el sentido de si un paciente se beneficiará o no de la terapia concurrente con radio o quimioterapia, que además tiene implicaciones económicas para los sistemas de salud.

Con el conocimiento previo de que existen marcadores genéticos para la mayoría de los tipos de cáncer, se analizó cuál o cuáles de los marcadores genéticos pueden ser útiles en la clínica para apoyar las decisiones de tratamiento y, además, dar al paciente y a su familia un panorama más claro del pronóstico de acuerdo con el resultado histopatológico y completado con los estudios de dichos marcadores. Lo anterior, con fundamento en los reportes de la bibliografía.

Otra pregunta importante que se hace con frecuencia es en relación con la supervivencia de los pacientes, casi siempre se reconocen algunos factores de mayor posibilidad de supervivencia a largo plazo, como la edad (pacientes jóvenes), localización frontal de la lesión, volumen tumoral reducido, cirugía citoreductiva combinada con radioterapia y temozolamida, y el género



femenino. Sin embargo, en el análisis de los grupos de pacientes no hay consistencia en cuanto a estos datos clínicos y demográficos por lo que tener una prueba con marcadores genéticos ha ayudado a diferenciar entre los pacientes que tendrán mayor supervivencia libres de enfermedad y los que tienen peor pronóstico a pesar del tratamiento efectuado.³

Los estudios clásicos de resonancia magnética con gadolinio han dado paso a una nueva forma de explorar los tumores gliales y su respuesta al tratamiento. En la actualidad, el examen de resonancia magnética se complementa con la espectroscopia que busca piruvato hiperpolarizado. Este método de estudio se ha asociado con la determinación de marcadores genéticos y se pudo demostrar que las células tumorales mutantes con IDH1 metilado en los gliomas de bajo grado producen, significativamente, menos lactato hiperpolarizado comparados con los glioblastomas multiformes; esto de acuerdo con su reprogramación metabólica.

Se han diseñado estudios, principalmente de imagen (resonancia magnética nuclear) para poder determinar la respuesta metabólica de los tumores a la temozolamida, con este método de diagnóstico. Se encontró que en los glioblastomas multiformes hay una marcada reducción de la transformación de lactato a piruvato hiperpolarizado a unas horas del inicio de la quimioterapia. Por lo tanto, este estudio de resonancia magnética muy especializado ayuda a diferenciar entre los astrocitomas no malignos y los malignos porque la asociación entre la disminución de la producción de lactato altamente polarizado y la mutación IDH1 es elevada.⁴

Métodos de laboratorio

Análisis de la metilación

En una cadena de ADN con una mutación IDH1 conocida, se utiliza un picograma de ADN como

una plantilla para la conversión a ADN bisulfatado; posteriormente se realiza una PCR-MS con montaje de *primers* específicos para la secuencia del promotor MGMT metilado y no metilado según la prueba de metilación específica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de la PCR se evalúan con electroforesis horizontal (teñida con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta). Durante el análisis de la metilación, la intensidad de las bandas presentes en el gel (93 pares de bases para la secuencia del promotor MGMT no metilado y 81 pares de bases para el metilado) se calificó con una escala de 5 puntos (del 1 al 5). Se utiliza como control una muestra de ADN metilado y no metilado proporcionado por el fabricante.

Las técnicas de inmunohistoquímica se hacen según los protocolos de cada fabricante. En términos generales se utilizan anticuerpos contra las proteínas que se pretende demostrar. Si hay menos de 10% de núcleos teñidos es negativa (+), si hay de 10 a 30% de núcleos teñidos (++) y si hay de 30 a 50% (+++) y más de 50% francamente positiva, se considera que la positividad a la inmunohistoquímica empieza desde ++ y +++.⁵

Papel potencial de los marcadores de metilación en la toma de decisiones clínicas

La metilación del ADN juega un papel importante en diversos procesos biológicos. Esta regulación epigenética contribuye a la regulación espacial y temporal de la expresión genética, inactivación del cromosoma X, señalización del genoma, infertilidad masculina y carcinogénesis. Se observó que las células cancerosas tienen una excesiva metilación de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, de la reparación del daño del ADN, apoptosis, detoxificación, diferenciación, angiogénesis y metástasis.^{6,7}

El GBM (astrocitoma grado IV) fue el primer cáncer seleccionado para análisis epigenético por el proyecto del atlas del genoma del cán-

cer; se analizaron 272 tumores y se observó alteración del promotor de metilación del ADN en un patrón denominado fenotipo metilador de la isla CpG-glioma. Estos tumores G-CIMP tienen distintas características moleculares, incluida una alta frecuencia de metilación del gen IDH1. Los pacientes con el genotipo G-CIMP fueron más jóvenes al momento del diagnóstico y tuvieron mejores pronósticos de forma estadísticamente significativa. La mutación IDH1 c. G395A; p. R132H se asoció con supervivencias más prolongadas en astrocitomas grado II y glioblastomas.^{8,9}

Las caracterizaciones de la naturaleza molecular de los gliomas de bajo grado confirmaron la existencia de una mutación IDH1 ya conocida y la codeleción 1p/19q (pérdida completa del brazo largo del cromosoma 1 y del brazo corto del cromosoma 19) como marcadores predictivos.¹⁰

En los astrocitomas grado III y glioblastoma multiforme se ha observado hipermetilación en 53% de los casos y hasta 61.4% en los casos de astrocitomas grado II.

Estudios previos demostraron que la mutación IDH1 c.G395A; pR132H es más frecuente en los astrocitomas de alto grado.

Los hallazgos han sugerido que el grupo de pacientes con astrocitomas grado II tiene un mejor pronóstico, sobre todo los que tienen la mutación IDH1 p. R132H, comparados con otros con mutación IDH1 silvestre.

La combinación más favorable para tener éxito con el tratamiento de radioterapia es la combinación de la mutación somática IDH1p.R132H con la hipermetilación de MGMT.

Reportes amplios han señalado que existe un papel del gen IDH1 mutado en la resistencia a la temozolamida. Se ha demostrado el aumento de

3 a 10 veces más de resistencia a la temozolamida después de un plazo largo de tratamiento.^{11,12}

Es importante tomar en cuenta que un paciente puede considerarse como superviviente a largo plazo cuando tiene una evolución entre 3 y 5 años de diagnóstico.

En los enfermos tratados después del diagnóstico de glioblastoma multiforme, en ocasiones, es difícil determinar si hay progresión de la enfermedad debido a que la radioterapia utilizada puede destruir la barrera hematoencefálica y ocasionar la efusión del medio de contraste y provocar resultados falsos en la interpretación de la resonancia magnética nuclear para determinar si hay o no recurrencia de la enfermedad. Esta pseudoprogresión va de 12 a 64% de los pacientes por lo que es importante para los clínicos distinguir si hay o no recurrencia tumoral. De todos los estudios diseñados para poder dar respuesta a tal diferencia, la determinación de la metilación del promotor MGMT y la mutación IDH1 ya demostró ser un factor predictivo importante de supervivencia en este grupo de pacientes y ayuda a determinar cuál es el mejor esquema de tratamiento para ellos.¹³

Otros marcadores que se han analizado para el estudio del pronóstico de este grupo de pacientes es el gen ATRX (ataxia, talasemia, retardo mental asociado a X) y la expresión de la proteína p53, mediante inmunohistoquímica con anticuerpos contra ATRX, p53, e IDH1 R132H. En los resultados se reporta que los pacientes con glioblastoma multiforme tenían expresión perdida de ATRX en 15.3%, sobreexpresión de p53 en 48.4% y positividad a IDH1 en 10.4%. La supervivencia fue mejor (con significación estadística) en los pacientes que mostraron ATRX- o IDH1 + comparados con pacientes ATRX+ o IDH1 -. **Cuadro 1**

Los pacientes con sobreexpresión de p53 + tuvieron peor supervivencia que los pacientes



Cuadro 1. Resultados de la inmunoexpresión de ATRX, IDH y p53 en GBM mediana de supervivencia y supervivientes libres de progresión

Proteína mutante	Inmunohistoquímica. porcentaje de positividad. n (%)	Mediana de supervivencia (meses)		Mediana de periodo libre de enfermedad (meses)	
		Proteína mutante	Proteína silvestre	Proteína mutante	Proteína silvestre
ATRX-	25 (15.3)	32.9	21	25.9	16.9
IDH1 +	17 (10.4)	31.9	21.8	28.1	17.2
p53+	80 (48.4)	19.3	26.2	15.8	20.6

Fuente: Arroyo y cols. de datos de diferentes artículos.

con p53 -. La conclusión es que la expresión aberrante de proteínas de ATRX, p53 e IDH1 individualmente y en diferentes combinaciones provee los datos suficientes para estratificar los glioblastomas en grupos relevantes para el pronóstico y pueden usarse como marcadores para tal fin.^{14,15}

CONCLUSIONES

Existen métodos de laboratorio que pueden utilizarse como marcadores de pronóstico en los pacientes con tumores cerebrales para determinar la supervivencia de los pacientes y su probable respuesta al tratamiento. Destaca entre ellos la determinación del gen metilado de IDH1. La resonancia magnética con espectroscopia con piruvato hiperpolarizado ayuda a determinar si el paciente tiene o no recaída tumoral, con diferencia entre la persistencia de la enfermedad contra los efectos mediatos de la radioterapia; así como de la respuesta inmediata a la temozolamida. Otros marcadores útiles son la determinación mediante inmunohistoquímica de proteínas codificadas por el gen de alfa-talasemia, retardo mental, ligado a X (ATRX) de la expresión de la proteína p53 y del gen metilado de IDH; pueden usarse en diferentes combinaciones para clasificar la probable respuesta de los pacientes al tratamiento.

Se propone el uso habitual de este tipo de marcadores de la enfermedad en los pacientes

que se atienden en el servicio de Neurocirugía y Radio-oncología del Hospital Central Militar.

Se propone hacer un estudio de impacto económico de los astrocitomas con cirugía, radio y quimioterapia *versus* el tratamiento guiado con marcadores biológicos si se supone que nuestra población tiene la misma expresión genética para la metilación del gen IDH1.

Se propone mejorar el programa de la resonancia magnética nuclear para tener disponible la espectroscopia con piruvato y evaluar la respuesta temprana a la quimioterapia y hacer diferenciación entre recidiva (progresión) de la enfermedad y cambios inducidos por radioterapia, lo que evitará la cirugía innecesaria y mayor gasto, redistribuyendo los recursos de forma más adecuada.

REFERENCIAS

1. Greenberg M. Stroke. En: Greenberg M Handbook of Neurosurgery. 7a ed. USA. Thieme Publishers; 2013. p.1010-1032.
2. Ferguson SD, Xiu J, Weathers SP, Zhou S, Kesari S, Weiss SE et al. GBM-associated mutations and altered protein expression are more common in young patients. *Oncotarget*. 2016;7(43):69466-69478.
3. Millward CP, Brodbelt AR, Haylock B, Zakaria R, Baborie A, Crooks D et al. The impact of MGMT methylation and IDH-1 mutation on long-term outcome for glioblastoma treated with chemoradiotherapy. *Acta Neurochir (Wien)*. 2016;158(10):1943-53.

4. Chaumeil MM, Radoul M, Najac C, Eriksson P, Viswanath P, Blough M et al. Hyperpolarized (13)C MR imaging detects no lactate production in mutant IDH1 gliomas: Implications for diagnosis and response monitoring. *Neuroimage Clin.* 2016; 23(12):180-189.
5. Chaurasia A, Park SH, Seo JW, Park CK. Immunohistochemical analysis of ATRX, IDH1 and p53 in glioblastoma and their correlations with patient survival. *J Korean Med Sci.* 2016; 31(8): 1208-1214.
6. Roszkowski K, Furtak J, Zurawski B, Szyłberg T and Lewandowska MA. Potential role of methylation marker in glioma supporting clinical decisions. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17 (11): 1876-1881.
7. Rodríguez FJ, Vizcaino MA, Lin MT. Recent advances on the molecular pathology of glial neoplasms in children and adults. *J Mol Diagn.* 2016; 18 (5):620-634.
8. Mandel JJ, Caccia D, Liu D, Wilson C, Aldape K, Fuller G, de Groot JF. Impact of IDH1 mutation status on outcome in clinical trials for recurrent glioblastoma. *J Neurooncol.* 2016;129(1): 147-154.
9. Ohno M, Narita Y, Miyakita Y, Matsushita Y, Arita H, Yone-sawa M et al. Glioblastomas with IDH1/2 mutations have a short clinical history and have a favorable clinical outcome. *Jpn J Clin Oncol.* 2016; 46(1):31-39.
10. von Felten LS, Frank S, Boulay JL, Mariani L. IDH mutation is associated with higher risk of malignant transformation in low-grade glioma. *J Neurooncol.* 2016; 127(2):363-372.
11. Xiu J, Piccioni D, Juarez T, Pingle SC, Hu J, Rudnick J et.al. Multi-platform molecular profiling of a large cohort of glioblastomas reveals potential therapeutic strategies. *Oncotarget.* 2016; 7(16): 21556–21569.
12. Hailong L, Jiye L, Gang Ch, Jianning Z, Xuezhen L. IDH mutation and MGMT promoter methylation are associated with the pseudoprogression and improved prognosis of glioblastoma multiforme patients who have undergone concurrent and adjuvant temozolomide-based chemoradiotherapy. *Clin Neurol Neurosurg.* 2016;151 (1): 31-36.
13. Kim HR, Lee JJ, Lee JI, Nam DH, Suh YL, Seol HJ. Malignant glioma with neuronal marker expression: A clinicopathological study of 18 cases. *J Korean Neurosurg Soc.* 2016; 59(1): 44–51.
14. Wang HY, Tang K, Liang TY, Zhang WZ, Li JY, Wang W et al. The comparison of clinical and biological characteristics between IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(86):1-9.
15. Reich TR, Switzeny OJ, Renovanz M, Sommer C, Kaina B, Christmann M et al. Epigenetic silencing of XAF1 in high-grade gliomas is associated with IDH1 status and improved clinical outcome. *Oncotarget* 2017; 8 (1): 15071-15084.