

TESIS DOCTORAL

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICO-MOLECULARES Y MODELOS PREDICTIVOS EN GLIOBLASTOMA MULTIFORME A PARTIR DE UNA EXPERIENCIA INTRAMURAL: SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA (2000 - 2010)

Doctorando: Carlos López López

Director: Dr. Jose Manuel López Vega

Co-Director: Prof. Jaime Sanz Ortiz

Tutor: Prof. Jose Antonio Riancho Moral

Santander, enero de 2016

**“CLINICAL AND MOLECULAR PROGNOSTIC FACTORS AND PREDICTIVE
MODELS IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME FROM AN INTRAMURAL
EXPERIENCE: MEDICAL ONCOLOGY DEPARTMENT
AT UNIVERSITY HOSPITAL MARQUES DE VALDECILLA (2000 - 2010)”**

Carlos López-López
University of Cantabria
Dept. of Medicine y Psychiatry.

2016 Santander, Spain



Facultad de Medicina

Departamento de Medicina y Psiquiatría

Don José Manuel López Vega, Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid y Don Jaime Sanz Ortiz, Doctor en Medicina por la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: “Factores pronósticos clínico-moleculares y modelos predictivos en glioblastoma multiforme a partir de una experiencia intramural: Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (2000 – 2010)” que presenta el Licenciado en Medicina Don Carlos López López, ha sido realizado bajo su dirección y reúne, a su juicio, la originalidad y contenidos suficientes para que pueda ser defendido y opte al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, firman la presente, en Santander a 22 de Enero de 2016.

Dr. José Manuel López Vega

Prof. Jaime Sanz Ortiz

Prefacio

No recuerdo claramente el momento exacto en el que tomé la decisión definitiva de estudiar Medicina, pero sin duda sé que lo hice hace ya mucho tiempo. Es posible que esta circunstancia no fuese producto de un hecho puntual, pero no tengo ninguna duda de que son precisamente los contactos y conversaciones puntuales con otras personas del entorno, las que finalmente te impulsan a tomar una gran mayoría de tus decisiones. Visto así, tiene sentido afirmar que la “vida social” y, entre otras cosas, esas personas a las que me refiero y con las que convivimos diariamente tienen por tanto un impacto muy importante en lo que al final somos y hacemos.

Esta Tesis trata precisamente de eso, de las relaciones entre los diferentes aspectos de un enfermo y su enfermedad, de su evolución y por último de su desenlace. Intenta además, de un modo muy pretencioso, averiguar el modo en el que todas estas características se relacionan e interaccionan entre si, influyendo en mayor o menor medida unas sobre otras.

En mi caso, algunas de esas personas de las que hablo han estado ahí desde hace muchos años y otras se han ido incorporando con el paso del tiempo, otras sin embargo desgraciadamente ya no están, aportándome muchos de esos contactos y conversaciones que me han dirigido finalmente hasta lo que soy y hago a día de hoy.

Muchas pertenecen a mi entorno laboral. No solo me refiero a todos y cada uno de mis compañeros en el Servicio de Oncología Médica, sin cuyo apoyo hubiese sido totalmente imposible iniciar y, por supuesto, acabar esta tesis. También han contribuido de forma importante desde otros muchos servicios del hospital. Me gustaría destacar en este sentido a los compañeros de Anatomía Patológica por haberme ayudado con las técnicas y permitido compartir con ellos algunas que otras horas de microscopio.

Como no, gracias a los enfermos, que tantas horas aguardan pacientemente a las puertas de las consultas para poder contarnos sus múltiples preocupaciones con la esperanza de que podamos, al menos, escucharlos.

Por supuesto, no debo olvidarme de mis amigos del departamento de “Matemática Aplicada y Ciencias de la Computación” que, como grandes docentes que son y mejores personas, se han tenido que armar de una inmensa paciencia para intentar meter en la dura mollera de un médico profano unos mínimos conceptos de estadística que espero sea capaz de retener en mi cabeza por algún tiempo.

A Javier Llorca, a Marta, a Antonio, a Eloy, a Javier Gómez y a Juan, por acudir sin dudarlos a mi precipitada llamada de aquel día en que les asalté con mi propuesta para que me escucharan “hablar de mis cosas” durante al menos una hora.

A mi antiguo jefe, Jaime, por insistirme constantemente y hacerme entender que este asunto de la Tesis es importante.

Pero sin duda, si hay alguien que merece mi más sincero agradecimiento, respeto y admiración, por haberme “llevado en volandas” hasta el final de este trabajo, prestarme durante todo este tiempo una parte de su admirable claridad mental y, además, por ser una de las personas con las que he compartido mil y una de esas conversaciones, ese es “el primín”. GRACIAS por todo, JOSE MANUEL.

Sobra decir lo agradecido que estoy a mis padres, Jose Manuel y Maria Antonia (PAPÁ y MAMÁ), por haber confiado siempre en mí. Porque a base de esfuerzo y sacrificio han conseguido no tener que decirme que no a nada de lo que hasta ahora les he pedido. Por haberme animado siempre a estudiar y ha hacerlo “a mi manera”. También a mis “padres políticos”, Manolo y Toñi, por arrimar el hombro y hacer además de abuelos siempre que nos ha hecho falta. A mis hermanos, Jose Manuel, Marian y Vanesa, por soportar con resignación mis “pataletas” y mi mal genio. Para vosotros también “abuelito y abuelita”. Se que, sin duda, os hubiese gustado mucho poder vivir éste y otros eventos que han tenido lugar durante los últimos años a mi alrededor. Al resto de mis familiares, por ser eso: mi familia.

A todos mis amigos, por ser eso: mis amigos.

Y por último, MUCHÍSIMAS GRACIAS a “MI SOL y MIS DOS ESTRELLAS” por iluminar mi camino y darme esa alegría necesaria para desarrollar todo tipo de labor que exige un sobreesfuerzo. No hay palabras para poder expresar lo que realmente merecéis. Gracias por vuestra paciencia, por vuestra comprensión, por vuestro amor,...todos ellos infinitos y presentes a diario. Habéis sido la clave de que todo esto haya salido adelante. Gracias CARMEN, MARTINA y MANUELA. Soy muy afortunado.

En resumen, me gustaría agradecer a TODA ESTA GENTE, espero de veras no haberme olvidado de ninguno, por el simple hecho de HABER ESTADO AHÍ en todo momento para ayudarme y apoyarme siempre que lo he necesitado y, lo que es aún más importante, sin pedirme nada a cambio. Estoy seguro de que, afortunadamente, es poco probable que exista un modelo probabilístico que pueda explicar de forma fiable este tipo de relaciones...

Carlos López López

Santander, 22 de enero de 2016.

Índice

Prefacio.....	VII
Índice	IX
Organización de la Tesis	1
1. Estructura.....	3
2. Oportunidad en el contexto actual	3
3. Listado de abreviaturas y acrónimos	4
I. Introducción	7
1. Tumores del sistema nervioso central	9
2. Astrocitomas de alto grado. Glioblastoma multiforme	10
2.1 Genética molecular del GBM.....	11
2.2 Diagnóstico.....	17
2.3 Manejo terapéutico actual	19
2.4 Pronóstico	28
3. Sistemas inteligentes probabilísticos. Redes bayesianas...	30
3.1 Redes probabilísticas	32
3.2 Redes bayesianas.....	32
II. Descripción del proyecto	37
1. Hipótesis de trabajo	39
2. Objetivos.....	39
III. Pacientes y métodos.....	41
1. Población incluída	43
2. Variables a estudio	43
2.1. Características de los pacientes.....	43
2.2 Características del tumor.....	45
2.3 Características del tratamiento	45
2.4 Características a la recaída o progresión tumoral y evolución	47
3. Estudios de patología molecular	48
3.1 Inmunohistoquímica	48
3.2 RT-PCR para metilación del promotor de MGMT.....	53

4. Análisis de supervivencia	55
4.1 Variables temporales.....	58
4.2 Metodología estadística.....	59
4.3 Modelos probabilísticos. Redes bayesianas.....	60
5. Subpoblaciones especiales. Análisis específicos.....	62
5.1 Pacientes con resección tumoral completa	62
5.2 Pacientes con biopsia o resección tumoral parcial	63
6. Consideraciones prácticas.....	63
IV. Resultados	65
1. Características generales de la población	67
2. Maniobras terapéuticas	69
3. Patología molecular	72
4. Análisis de supervivencia	75
4.1 Análisis de variables y SLRP	76
4.2 Análisis de variables y SG	80
4.3 Asociaciones entre variables clínicas y tratamientos aplicados	84
5. Análisis de subpoblaciones	87
5.1 Pacientes con resección tumoral completa	87
5.2 Pacientes con biopsia o resección tumoral parcial	92
6. Modelos probabilísticos. Redes bayesianas.....	97
6.1 Modelo o red total.....	97
6.2 Modelo o red clínica	106
6.3 Red molecular	110
V. Discusión y comentarios	111
1. <u>Objetivo primero:</u> Describir la población de pacientes con	
GBM tratados en el H.U. Marqués de Valdecilla (2000-2010) .	113
1.1 Características clínicas.....	113
1.2 Tratamientos empleados	114
1.3 Características moleculares	116

2. <u>Objetivo segundo:</u> Análisis de supervivencia. Búsqueda de variables pronósticas.	119
2.1 Variables relacionadas con los pacientes.....	120
2.2 Variables relacionadas con los tumores.....	121
2.3 Variables relacionadas con los tratamientos	121
2.4 Variables relacionadas con las características clínicas a la recaída o progresión	123
2.6 Asociaciones entre variables clínicas y tratamientos	125
2.7 Análisis multivariante (Regresión de Cox).....	126
3. <u>Objetivo tercero:</u> Análisis de subpoblaciones.....	128
3.1 Pacientes con resección tumoral completa	128
3.2 Pacientes con biopsia o resección tumoral parcial.....	130
4. <u>Objetivo cuarto:</u> Creación de redes bayesianas.....	133
VI. Conclusiones y líneas futuras	135
1. Conclusiones de la Tesis	137
2. Líneas futuras de investigación.....	137
Índice de tablas	141
Índice de figuras.....	143
ANEXO 1. Protocolo de inmunohistoquímica.....	145
ANEXO 2. Extracción con <i>DNA sample preparation kit</i>	147
ANEXO 3. Variables no significativas en el análisis de supervivencia de subpoblaciones específicas	149
Bibliografía	153

Organización de la Tesis

Organización de la Tesis

1. Estructura

Esta Tesis está organizada en seis capítulos. El primero resume el estado del arte en relación con la epidemiología, las principales características moleculares, los aspectos diagnósticos y terapéuticos del glioblastoma multiforme (GBM). Además se hace una breve introducción a la metodología de las redes bayesianas (RB).

Tras exponer la hipótesis de trabajo y los objetivos de la Tesis, en el segundo capítulo, se dedica el tercero a describir la población objeto de estudio, las variables analizadas y la metodología empleada.

Los resultados obtenidos tras el análisis de la serie clínica son expuestos en el capítulo cuarto. Allí se empieza con observaciones clínicas y luego se describen los análisis de supervivencia y la investigación de variables potencialmente relacionadas con ésta. En el mismo apartado se exploran distintos subgrupos pronósticos y se realizan análisis centrados en esas subpoblaciones específicas. Para cerrar este capítulo se proponen varios modelos probabilísticos generados a partir de datos y variables clínicas y moleculares.

El capítulo quinto consiste en la discusión y puesta en contexto de los resultados obtenidos. El orden de este apartado remeda el de los objetivos previamente expuestos en el segundo capítulo.

Finalmente, en el capítulo sexto, se presentan las conclusiones finales de la Tesis y las líneas futuras de investigación.

2. Oportunidad en el contexto actual

El glioblastoma multiforme (GBM) es una neoplasia relativamente frecuente entre las del sistema nervioso central (SNC), que se caracteriza por su excepcional agresividad y por acarrear altas tasas de mortalidad.

Su incidencia ha ido en aumento progresivo durante los últimos años. La etiología de estos tumores es una incógnita, no existiendo aún a día de hoy datos concluyentes ni asociaciones claramente demostradas en este sentido.

Tras una tentativa quirúrgica inicial con doble intención, diagnóstica y terapéutica, el estándar de tratamiento actual consiste en una combinación de radioterapia (RT) y quimioterapia (QT). Desgraciadamente, aún cuando se logre una extirpación aparentemente total y se complete un posterior programa de RT y QT adecuadas, la recaída tumoral es la norma. Así la supervivencia libre de recaída o

progresión (SLRP) y la supervivencia global (SG) en las series clínicas más numerosas no van en general más allá de 6-8 meses y 14-16 meses respectivamente, permaneciendo vivos escasamente un 25% de los enfermos a los 2 años del diagnóstico.

Aparte de los factores pronósticos clásicos, que son la situación general del enfermo (*performance status*, PS) y quizás el volumen de tumor resecado por el neurocirujano, no existen variables clínicas de suficiente fiabilidad para determinar si los pacientes se agrupan en distintas clases pronósticas. Más aún, a pesar de que cada vez se conocen más datos acerca de los mecanismos oncogénicos subyacentes y las alteraciones moleculares en el GBM, tampoco existe confirmación definitiva de que ninguna variable molecular sea de utilidad pronóstica en la práctica cotidiana.

Por otro lado la mayoría de los trabajos llevados a cabo en este tipo de neoplasias analizan de forma conjunta tanto las características de los enfermos como los resultados de supervivencia obtenidos tras aplicar los tratamientos, sin hacer distinciones en función de factores que a priori pudiesen ser de relevancia, como por ejemplo el tipo de cirugía practicada.

A la vista de lo anterior, sería sin duda deseable el hecho de poder disponer de más información pronóstica contrastada para tratar de orientar las decisiones terapéuticas tomadas durante la práctica asistencial diaria en este contexto. Probablemente sea la suma de la existencia o no de varios de estos factores clínicos (huésped) y moleculares (tumor) junto con todas sus potenciales interacciones, la que quizás pueda ser capaz de aproximarse de forma más fiable a una teórica evolución en cada uno de estos enfermos.

En este contexto se ha llevado a cabo este trabajo con la intención de tratar de conseguir identificar varias de estas características clínicas y/o moleculares que puedan ayudar a clasificar a los enfermos con GBM, tratar de generar herramientas útiles a la hora de clasificar a estos enfermos en diferentes subgrupos pronósticos en función de sus probabilidades de supervivencia y con todo ello, en definitiva, intentar contribuir a la toma de decisiones, adecuando así el esfuerzo terapéutico a emplear en cada subpoblación en función de su pronóstico.

3. Listado de abreviaturas y acrónimos

AA: Astrocitoma anaplásico.

BHE: Barrera hematoencefálica.

Bx: Biopsia.

DFH: Difenilhidantoina.

Dx: Diagnóstico.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

GBM: Glioblastoma multiforme.

IQ: Cirugía.

IHQ: Inmunohistoquímica.

MGMT: 06-metilguanin-ADN metiltransferasa.

PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PS: *Performance Status* o situación física general del enfermo.

QT: Quimioterapia.

RB: Redes bayesianas.

RC: Resección tumoral completa.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RP: Resección tumoral parcial.

RT: Radioterapia.

RTK: Receptores de factores de crecimiento ligados a tirosina quinasas.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa “en tiempo real”.

Rx: Radiología.

SG: Supervivencia global.

SLP: Supervivencia libre de progresión.

SLR: Supervivencia libre de recaída.

SLRP: Supervivencia libre de recaída o progresión.

SNC: Sistema nervioso central.

Sv: Supervivencia.

TAC: Tomografía axial computadorizada.

TMA: *Tissue microarray*.

TMZ: Temozolomida.

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial.

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1. Tumores del sistema nervioso central

Las neoplasias primarias del sistema nervioso central (SNC) constituyen un grupo heterogéneo de tumores originados a partir de distintas estirpes celulares.

Los datos epidemiológicos disponibles proceden fundamentalmente de registros realizados en EEUU y Europa, aunque algunos registros regionales en España arrojan cifras similares.

Según las cifras de GLOBOCAN 2012 este tipo de tumores representa, dependiendo de las áreas geográficas, entre el 1,3 y el 1,8 % de todas las neoplasias malignas y es responsable del 2,6 % de todas las muertes relacionadas con cáncer. La incidencia de estos tumores oscila entre los 3-10 casos / 100.000 personas-año. La tasa de mortalidad anual ajustada a la edad fue de 2,5 / 100.000 personas-año. Según este mismo registro, en España la incidencia es de 5,1 casos /100.000 personas-año (3.717 casos, que los sitúan en 15º lugar entre las neoplasias sólidas) y la mortalidad es de 3,3 muertes / 100.000 personas-año (2.668 fallecimientos, que suponen la 10ª causa de muerte por cáncer). En resumen, se trata de neoplasias con un alto potencial deletéreo.¹

A pesar de que son tumores relativamente poco frecuentes, su incidencia viene experimentando un crecimiento progresivo en los últimos 50 años. El motivo de este incremento es desconocido, ya que la etiología de estos tumores es una incógnita. Se atribuye este fenómeno en parte a la introducción de técnicas diagnósticas no invasivas como la TAC o la RMN y al paulatino mayor acceso de población anciana a los sistemas sanitarios. Sin embargo, aún dentro de los países muy desarrollados viene observándose un aumento de la incidencia, sin clara relación con la etnia, el sexo o el área geográfica.²

Son interesantes en este punto los estudios epidemiológicos llevados a cabo en poblaciones migratorias. Se ha visto que los individuos que se trasladan desde una zona menos desarrollada, en principio de baja incidencia, hacia un país más industrializado adquieren, tras un período de permanencia, las tasas de incidencia correspondientes al nuevo asentamiento. Este hecho sustentaría la hipótesis de una etiopatogenia ligada a factores ambientales. Sin embargo, los análisis dirigidos a identificarlos no han sido concluyentes.³

En cuanto a las características generales de los pacientes, parece existir un ligero predominio entre la población masculina y la raza caucásica. El pico de incidencia para este tipo de neoplasias está entre la 6ª y 7ª décadas de la vida. El GBM, por ejemplo, raramente se presenta antes de los 15 años, aumentando su incidencia de forma progresiva a partir de los 45 años.^{1,4}

La mayoría de los tumores “primarios” del SNC son gliomas. A su vez, la mayor parte de éstos se encuentran dentro del grupo de los denominados como astrocitomas. Estas neoformaciones se clasifican siguiendo el esquema propuesto por la OMS.⁵ Hasta el 80% de estos tumores, dependiendo de las series, están emplazados dentro del grado IV de la OMS. Si se tiene en cuenta el hecho de que éste es el subgrupo que presenta un comportamiento “más agresivo”, se pueden justificar con facilidad las cifras de mortalidad referidas anteriormente para este grupo de tumores.⁶

2. Astrocitomas de alto grado. Glioblastoma multiforme

Los astrocitomas se agrupan desde el punto de vista anatomopatológico según el esquema de clasificación de la OMS del año 2007. En función de sus características histológicas (microscopía óptica) y eventualmente por la presencia de ciertas alteraciones genéticas, se distinguen cuatro categorías. (tabla I) Ordenados de menor a mayor agresividad, existen gliomas de bajo grado (grupos I y II de la OMS) y gliomas de alto grado (grupos III y IV). Dentro de este último grupo, el grado III corresponde al astrocitoma anaplásico (AA) y el grado IV está conformado por el glioblastoma multiforme (GBM).

Tabla I. Gradación OMS de los tumores del SNC Modificada de “Table 2 WHO Grading of Tumours of the Central Nervous System”.				
Grado	I	II	III	IV
Astrocitoma subependimario de células gigantes	X			
Astrocitoma pilocítico	X			
Astrocitoma pilomixóide		X		
Astrocitoma difuso		X		
Xantoastrocitoma pleomórfico		X		
Astrocitoma anaplásico (AA)			X	
Glioblastoma (GBM)				X
Glioblastoma de células gigantes				X
Gliosarcoma				X

Entre otras características, las categorías diagnósticas vienen definidas principalmente por la actividad mitótica y la atipia celular. El grado IV o GBM, el más

frecuente y agresivo de los gliomas, se caracteriza por un patrón abigarrado, con intensa proliferación vascular y con áreas de necrosis intratumoral.⁵ (Fig.1)

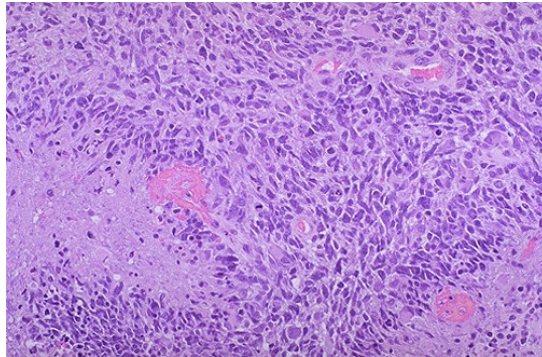


Figura 1. Glioblastoma multiforme (Hematoxilina eosina)

Tomada y modificada de www.oncolink.org

Desde el punto de vista patogénico, se distingue el GBM “secundario” (5% de los casos) cuando proviene de la progresiva malignización de un astrocitoma de bajo grado preexistente, en contraposición al GBM “primario” o de novo (95%) que se manifiesta de entrada como tal. A continuación se describen sus respectivas alteraciones genéticas.⁷

2.1 Genética molecular del GBM

Su origen y progresión van unidos a una serie de alteraciones por las cuales las células tumorales incrementan de forma descontrolada su ritmo de proliferación. Estas alteraciones están comprendidas dentro de alguno de los siguientes apartados: activación de oncogenes promotores, inhibición de genes supresores, desactivación de genes inductores de apoptosis y lesión de los genes implicados en la reparación de daños del ADN. Dichos mecanismos no son excluyentes entre sí y de hecho suelen coexistir en un mismo tumor.

Algunas alteraciones aparecen típicamente asociadas al GBM. A continuación se citan las más relevantes.

Vía TP53/MDM2/p14^{ARF}. La génesis de los gliomas de bajo grado exige la presencia de al menos dos de los mecanismos enumerados anteriormente: la inactivación del gen supresor de tumores TP53 y la pérdida de determinadas secuencias de bases situadas en el cromosoma 22q, aún por identificar.⁵

El gen TP53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p) y codifica para la síntesis de la proteína p53, pieza fundamental en la regulación del ciclo celular. Esta proteína desempeña un importante papel en procesos como el “arresto” o suspensión del ciclo celular en caso de detectarse alguna anomalía o

daño a nivel del ADN hasta que se lleva a cabo su reparación, o en caso de no ser posible esto, la inducción de apoptosis celular. A su vez MDM2, cuya transcripción es inducida por la forma no mutada de TP53, es capaz de unirse a TP53 inhibiendo su actividad (“feed-back” de autorregulación). Por último el producto proteico de la expresión de p14^{ARF} actúa también como regulador de este proceso inhibiendo en este caso a MDM2. Por lo tanto, la deficiente regulación de procesos de replicación celular y apoptosis frecuentemente implicados en la oncogénesis del GBM en relación con una disfunción de TP53, podría ser consecuencia de la pérdida de función o de variaciones en la expresión de cualquiera de estos tres genes.⁸

La inactivación de TP53 suele ser resultado de la existencia de una mutación previa en uno de los alelos seguida de la pérdida posterior del alelo restante. Este fenómeno, al parecer, juega un papel tanto en la génesis de los gliomas de bajo grado como en la transformación de estos en GBM secundarios, por ello es fácil comprender como dicha alteración está presente en menos de un tercio de los GBM primarios y en contraposición hasta en un 57% de los denominados GBM secundarios. Las mutaciones son, en su mayoría, del subtipo “missense” y suelen afectar a regiones del gen que codifican aminoácidos implicados en la unión de p53 al ADN (exones 5, 7, 8), perdiéndose de este modo la funcionalidad de la proteína.⁷

Alteraciones en otros componentes relevantes que forman parte de esta ruta de señalización intracelular como MDM2 y p14^{ARF} muestran diferentes frecuencias de aparición. Así mientras la amplificación de MDM2 está presente en menos del 10% de los GBM, apareciendo de forma exclusiva en pacientes con GBM primarios sin mutaciones de TP53, la pérdida de expresión de p14^{ARF} ocasionada generalmente por delección homocigota o metilación de su promotor de dicho gen se observa hasta en un 76% de los casos.⁹

Alteraciones en la “familia” de receptores de crecimiento ligados a tirosina quinasas (RTK). La amplificación aberrante, la delección o mutación de alguno de los RTK se detecta hasta en el 67,3% de los GBM.

El principal miembro de esta familia, y el más estudiado en este contexto, es el receptor para el factor de crecimiento epidermoide (EGFR). Las alteraciones de este gen localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (Cr7p), están descritas hasta en un 57,4% de estos tumores, estando este fenómeno fundamentalmente asociado con el desarrollo del GBM primario (40%) aunque dicho gen también se puede encontrar ocasionalmente sobreexpresado en algún GBM secundario (8%). Es significativo el hecho de que este fenómeno no se ha observado en los GBM con inactivación de TP53, estando la mutación presente de forma global en el 30% de los GBM.⁸ La variante más frecuentemente amplificada de esta anomalía, 50% de los casos, es el denominado EGFRvIII originado a partir de una delección en los exones 2 a 7 que confiere al receptor la capacidad de “autoactivarse” de forma constitutiva e independiente de la unión a su correspondiente ligando. Esta

activación da lugar a una señal mitogénica que favorece la proliferación y la supervivencia celular e inhibe la apoptosis mediante la activación de la vía efectora RTK/ RAS/ fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) / Akt / mTOR.¹⁰

El receptor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) es otro de los componentes de esta familia que puede estar alterado en los GBM. Este evento acontece en una etapa precoz dentro de la génesis de los tumores cerebrales siendo por ello más frecuente entre los GBM secundarios y estando por tanto con cierta frecuencia asociado a la alteración de TP53. La hiperactividad observada en este receptor, principalmente PDGFRA, o sus ligandos, generalmente PDGF- β , suele estar mediada por la presencia de un fenómeno de amplificación génica. Los reordenamientos o mutaciones a este nivel son menos comunes. Dicho hallazgo está presente hasta en un 11% de los GBM, siendo considerada así como la segunda en frecuencia después de las anomalías descritas en EGFR. Esta alteración sugiere la presencia de mecanismos auto y paracrinós que unidos a su acción activadora sobre la vía de señalización intracelular PI3K / Akt / mTOR, dan como resultado una promoción del desarrollo y posterior progresión tumoral de los GBM.¹¹

Otros miembros pertenecientes a este grupo de moléculas de la familia de los RTK implicados en el proceso de replicación celular y, por tanto, candidatos a presentar alteraciones que participen en el proceso de “tumorigénesis”, serían MET, IGF-1, bFGF, FGF-2, o el TGF α . Sin embargo, el papel de estas proteínas en la formación de los gliomas de alto grado, es menos conocido.

Perdida de heterocigosidad del cromosoma 10 (LOH Cr10) / PTEN. El gen PTEN / MMAC1 está localizado a nivel del brazo largo del cromosoma 10 (Cr10q). Los productos de su expresión están directamente implicados en el control del ciclo celular, perteneciendo este gen al denominado subgrupo de los llamados “genes supresores de tumores”. La mutación de PTEN da lugar al síndrome de Cowden (individuos afectados de tumoraciones en múltiples localizaciones entre las que se incluye el SNC).

La pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10 (LOH Cr10q) se describe en torno a un 60-85% de los casos de GBM, tanto “primarios” como “secundarios”, estando afectado PTEN hasta en un 15-40% de las ocasiones, fundamentalmente en los GBM primarios. Así ésta es la alteración genética más frecuente en este tipo de neoplasias. Este hecho parece formar parte de las anomalías que intervienen en la posible progresión de las células de la glía cerebral o gliomas de bajo grado hacia GBM.¹²

La pérdida de función de PTEN, al igual que el aumento de la actividad de los factores de crecimiento ligados a tirosina quinasas, ocasiona una desregulación de la cascada de señalización intracelular mediada por los ejes PI3K/Akt y Ras/MAPK,

que a su vez da lugar a un incremento en el ritmo de proliferación celular. Este mecanismo junto con la disminución de la capacidad para inducir apoptosis celular es, como ya se ha comentado, una pieza clave en el proceso de desarrollo tumoral. (Fig.2)

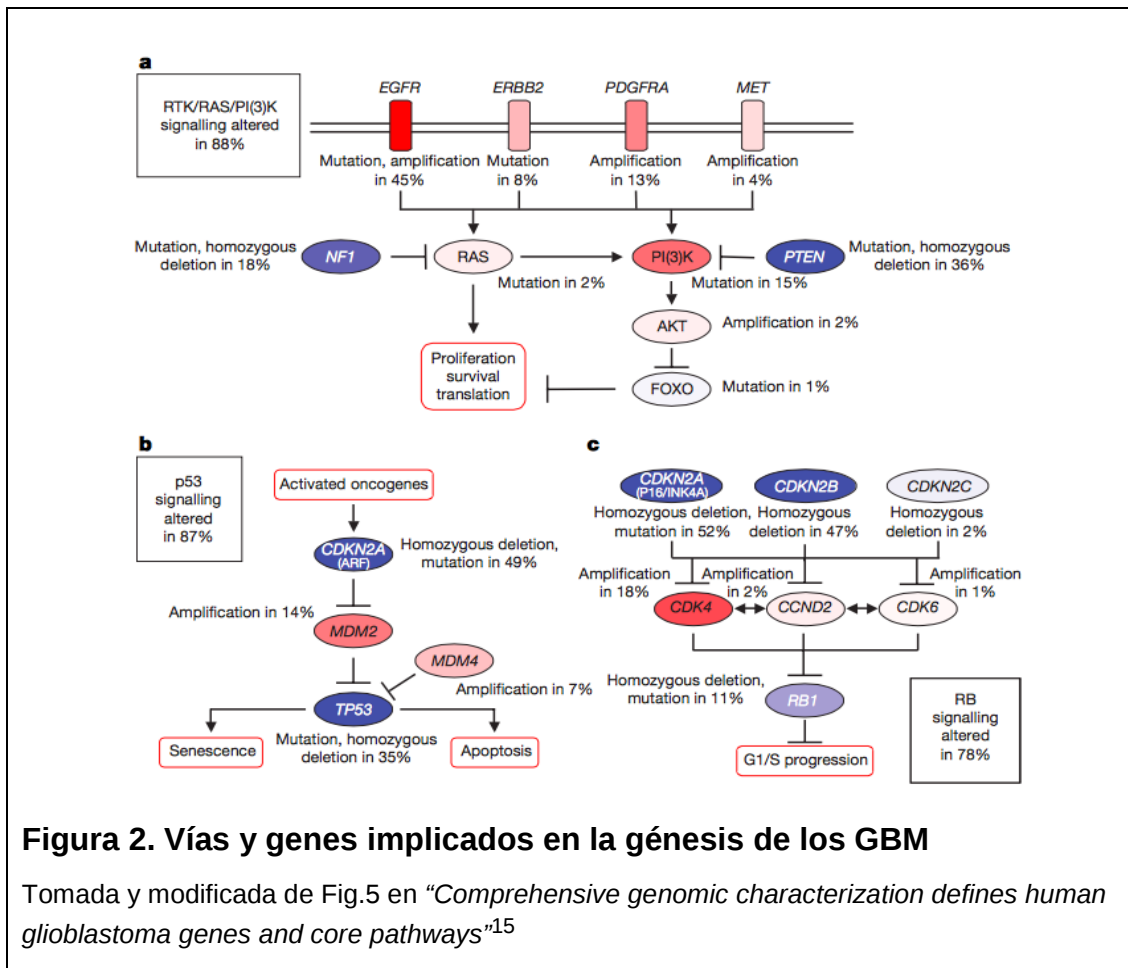
Dentro de esta misma vía, la amplificación de PI3KCA, componente también de esta vía, es poco frecuente en estos tumores (5-13%).¹³

Otros genes importantes en la transición hacia gliomas de alto grado. Existen otros genes involucrados en la transformación de los gliomas de bajo grado (OMS I y II) hacia AA o GBM. Destacan la inactivación de genes supresores tumorales presentes en los cromosomas 9p, 13q, 22q y 19q. Esta última anomalía presenta especial interés por tratarse de una mutación exclusiva de los gliomas, presente fundamentalmente en el caso de GBM secundarios (54%). Esta alteración no está descrita en ningún otro tipo de cáncer en humanos, siendo por otra parte, común a todos los subtipos de gliomas malignos.

Las alteraciones del brazo largo del cromosoma 13 (Cr13q), asiento del conocido como “gen del retinoblastoma” (RB1), tienen lugar en aproximadamente un tercio de los astrocitomas de alto grado. La presencia de metilación del promotor como mecanismo de inhibición de la expresión de dicho gen es frecuente, fundamentalmente de nuevo en los GBM secundarios.

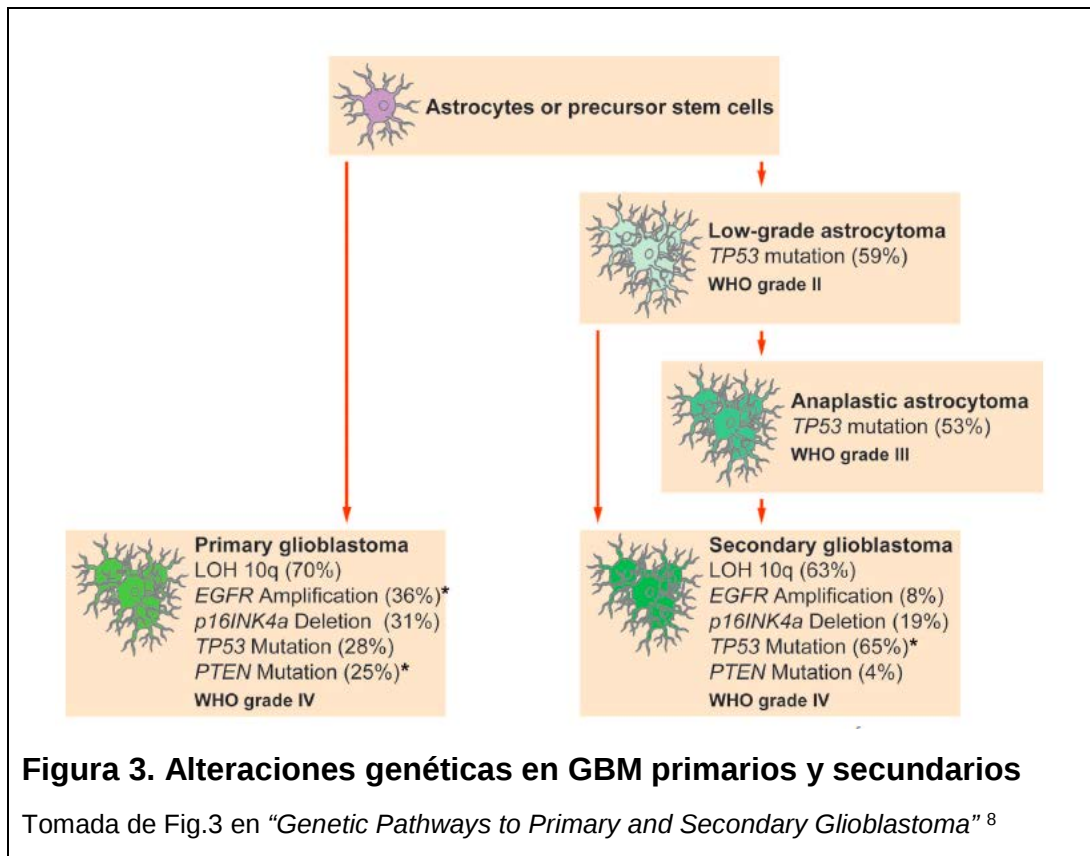
Por último, hasta dos tercios de estas neoplasias presentan delecciones en ambos alelos de determinadas regiones del brazo corto del cromosoma 9 (Cr9p). En esa localización se encuentran genes como CDKN2A (también denominado p16INK4A / MTS1) o CDKN2B (MST2). Los productos protéicos derivados de su expresión (pRb, p14ARF, p15, p16, CDK-4, ciclina D,...) son fundamentales para la adecuada regulación del ciclo de proliferación celular. Todos ellos participan de forma activa en los diferentes “puntos de control” que acontecen durante dicho proceso, encargándose de controlar el paso de una a otra fase dentro del mismo (G1-S y G2-M “checkpoints”).⁸

La (Fig.2) resume de una forma muy esquemática las principales vías implicadas en la génesis de este tipo de neoplasias.



IDH-1. Este gen situado en el brazo largo del cromosoma 2 (Cr. 2q), codifica una enzima implicada en el metabolismo oxidativo mitocondrial (ciclo de Krebs). En los últimos años se han descrito mutaciones frecuentes en gliomas de bajo grado y consecuentemente en algunos casos de GBM (8-10%), principalmente secundarios, que son capaces de estimular la producción de “factor inducible por hipoxia” (HIF-1 α) y con ello la proliferación tumoral. Según algunos autores estas mutaciones parecen conferir una mayor respuesta al tratamiento con RT y con ello un mejor pronóstico y evolución de los enfermos que las presentan.¹⁴

A modo de resumen de todo lo anterior, en función de la presencia o no de unas u otras de entre todas estas alteraciones moleculares, implicadas en la patogenia tumoral, se subdivide, como ya se ha mencionado previamente, a estas neoplasias en dos grande grupos GBM “primarios o secundarios”. En la (Fig. 3) se resumen las diferentes frecuencias de aparición de dichas mutaciones en los dos subtipos.



Por último, tanto la frecuencia aproximada como el patrón de asociación de las alteraciones genéticas presentes en este tipo de tumores se han tratado también de analizar mediante técnicas de secuenciación masiva de última generación fundamentalmente dentro de proyectos internacionales (Proyecto Atlas del Genoma del Cáncer).¹⁵ Los resultados observados han confirmado los datos previamente referidos y además han sugerido la existencia de diferentes “subtipos” de GBM, caracterizándolos en base a modelos de agrupación fundamentados en la presencia o no en el tejido tumoral de dichas anomalías.

Angiogénesis. Se puede afirmar que los gliomas malignos son, en general, tumores muy “vascularizados”. Por otro lado, la presencia de proliferación microvascular intratumoral es indicativa de un alto grado de agresividad de la neoplasia. Es ampliamente conocido el hecho de que entre la trama vascular de los AA y la de los GBM existe una gran diferencia.

La molécula más estudiada dentro de los factores que favorecen el crecimiento de los neovasos es el VEGF. Este factor, cuyo gen está situado en el brazo corto del cromosoma 6 (Cr6p), es capaz de unirse a determinados receptores transmembrana pertenecientes a la familia de los receptores ligados a tirosina quinasas presentes en la superficie de las células endoteliales (VEGFR). De esta forma se activa una cascada de señalización intracelular que desemboca en la formación de neovasos.

Otra proteína con capacidad para estimular el proceso de angiogénesis, es la cadena beta del PDGF (PDGFβ) que también posee receptores específicos en la superficie del endotelio vascular a tal efecto.¹⁶

En condiciones fisiológicas, el principal estímulo para que se produzca en el organismo un incremento de la producción de VEGF es la respuesta celular ante una situación de hipoxia. En esa circunstancia, los tejidos responden con un incremento en la síntesis del denominado “hypoxia-inducible factor” (HIF-1α) que a su vez es un mediador de la activación transcripcional del gen del VEGF.

Este factor de crecimiento es expresado en gran cuantía dentro del tejido que forma parte de los GBM y se ha observado que su concentración es más elevada en la periferia de las áreas de necrosis tumoral, presumiblemente como consecuencia del ambiente de hipoxia generado en torno a estas. Esta proteína, sin embargo, no ha sido aislada en astrocitomas de bajo grado. Teniendo en cuenta esta observación, se piensa que a lo largo del proceso de transformación desde tumoraciones menos agresivas hacia neoplasias con mayor “potencial invasivo”, la adquisición por parte de las células de la capacidad para expresar estos factores de crecimiento vascular puede jugar un papel protagonista.^{17,18}

2.2 Diagnóstico

Desde un punto de vista clínico, como se puede imaginar, la sintomatología originada por estas tumoraciones va a depender fundamentalmente de su localización y tamaño. La clínica será por lo tanto producto de la invasión directa del tejido nervioso por parte de la neoplasia, de la compresión de las estructuras adyacentes o del aumento de la presión intracraneal ocasionado por la expansividad local del tumor (sangrado intratumoral, edema perilesional,...) Sin embargo, su diseminación fuera del SNC es anecdótica.¹⁹

Según los hallazgos de algunas de las series más grandes de pacientes con astrocitomas de alto grado (AA o GBM) el síntoma de presentación mas habitual es la cefalea, presente al diagnóstico hasta en un (53-57%) de los casos. Las crisis comiciales son frecuentes en el caso de los AA (56%), formando parte del debut en solo un (23%) de los pacientes. Otros síntomas referidos por estos enfermos son los déficit motores o sensitivos, las alteraciones del comportamiento, los déficit de memoria o lenguaje, los síntomas visuales, etc.²⁰

Ante la sospecha de la existencia de cualquier proceso intracraneal, es mandatorio realizar un estudio de imagen dirigido. Tanto el TAC (Fig. 4A) como la RMN craneales (Figs. 4B y 4C) son de gran utilidad en este contexto, siendo de elección esta última por tratarse de un método con mayor capacidad para aportar información precisa acerca de la localización y extensión tumorales. Generalmente los gliomas malignos aparecen como lesiones “hipointensas” con captación

heterogénea de contraste en las secuencias potenciadas en T1, posibilitando estas imágenes hacer la distinción entre el tejido tumoral y el edema perilesional. Mientras, en las secuencias T2, tanto la lesión como el edema son hiperintensos, siendo imposible discernir entre ambos. Este margen observado en las secuencias T2 es, aunque de forma imprecisa, la manera más aproximada de intentar determinar el límite o frente de invasión tumoral. Sin embargo, células aisladas podrían extenderse más allá de esta línea. Esta circunstancia explicaría el frecuente patrón de recidiva local observado tras la extirpación quirúrgica aparentemente completa en este tipo de neoplasias.^{21,22,23}



Fig 4A. TAC craneal

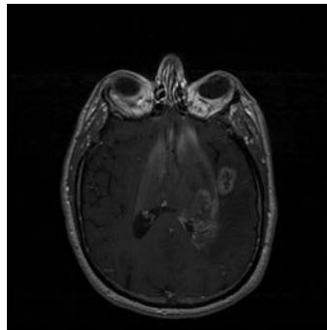


Fig 4B RMN craneal (Secuencia T1)

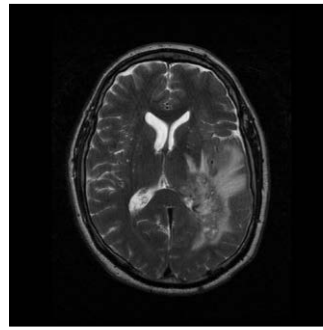


Fig 4C RMN craneal (Secuencia T2)

Figura 4. Imágenes radiológicas de GBM

Técnicas de imagen más sofisticadas, como la RMN funcional, los estudios de difusión y/o perfusión o la espectroscopia, están aún en fase de experimentación aunque es posible que todas ellas pudieran aportar información muy valiosa a la hora intentar diferenciar entre el área afectada por el tejido tumoral, con su correspondiente funcionalidad, y el edema asociado. Como es lógico, esta cuestión es de gran relevancia a la hora de plantear por ejemplo un abordaje quirúrgico preciso que garantice una extirpación radical del tumor, minimizando en lo posible los daños ocasionados en el tejido cerebral sano circundante. Otro escenario en el cuál estas técnicas pudiesen ser quizás de especial utilidad, es el de la diferenciación entre tumoraciones primarias del sistema nervioso central y otro tipo

de procesos intracraneales, incluidas metástasis. Por último hay quién incluso propone este tipo de estudios como una herramienta con capacidad de establecer grupos pronósticos o evaluar la potencial eficacia obtenida con los tratamientos antitumorales empleados en función de características radiológicas del tumor como el flujo sanguíneo o la densidad de vascularización detectada mediante este tipo de test.²⁴

El SPET o el PET son exploraciones dirigidas a la obtención de imágenes funcionales. Mediante estas técnicas, analizando el comportamiento de las lesiones intracraneales a estudio, se puede intentar aventurar la naturaleza benigna o maligna de las mismas. Las imágenes logradas con el SPET con talio 201 (TI-201) parecen aportar información importante a este respecto.²⁵ En cuanto al PET, puede ser de gran utilidad en determinados contextos como la detección tras una cirugía de intención radical de un tejido tumoral “residual”, el seguimiento de la posible respuesta tumoral “metabólica” y, sobre todo, la posibilidad de poder diferenciar entre una sospecha de recidiva tumoral y un área de radionecrosis secundaria a los tratamientos recibidos. Para realizar este tipo de estudios el radiotrazador más comúnmente empleado, la fluorodesoxiglucosa (¹⁸FDG), no es de utilidad. En este contexto son claramente más efectivos otros compuestos como la C-metionina (MET) o la fluoroethyltyrosina (FET), cuyo acceso está más restringido en nuestro medio.^{23,26}

A pesar de todos estos avances tecnológicos, se debe tener en cuenta que el diagnóstico diferencial de este tipo de procesos intracraneales incluye numerosas entidades patológicas con muy diversas etiologías (neoplásicas, infecciosas, vasculares, inflamatorias,...) que obviamente presentan entre si grandes diferencias en cuanto a su manejo terapéutico, pronóstico, etc. Por este motivo, como en la mayoría de las neoplasias sólidas, el diagnóstico definitivo de cualquier tumoración intracraneal pasa por la obtención de una muestra de tejido procedente de la lesión observada o biopsia. Este procedimiento es obligado fundamentalmente en la situación de un paciente sin diagnóstico histológico previo, pero también puede ser necesario en algunos casos con sospecha de recidiva tumoral, si los resultados de los test anteriormente mencionados son contradictorios.

2.3 Manejo terapéutico actual

Los GBM son neoplasias con un comportamiento clínico muy agresivo. Teniendo en cuenta tanto este aspecto como las peculiaridades del asiento anatómico de este tipo de tumores, es fácil deducir que su tratamiento es habitualmente dificultoso y muy complejo, que exige la participación de equipos multidisciplinares.

Las 3 grandes modalidades para el tratamiento de cualquier neoplasia son la cirugía (IQ), la radioterapia (RT) –ambas de acción puramente local-regional- y el

tratamiento sistémico, que incluye la quimioterapia (QT) y las modernas terapias “biológicas”.

Se analizará más detalladamente a continuación cuál es el papel de cada una de ellas dentro del tratamiento de los pacientes con GBM.

Cirugía. La extirpación quirúrgica de la lesión, cuando ésta es factible, es el tratamiento de elección para estos tumores.

No está claro si en el caso de los GBM, teniendo en cuenta su gran capacidad infiltrativa -con márgenes de invasión generalmente poco definidos-, es posible lograr la curación de los pacientes mediante el empleo exclusivo de esta maniobra. Así, la recidiva local es la regla en estos pacientes.

La idea de que la extensión de la resección quirúrgica es un factor pronóstico independiente en estos enfermos, es aún a día de hoy controvertida. Son muchos los estudios publicados, prospectivos y retrospectivos, a favor y en contra de la misma. En este sentido, los últimos datos publicados sugieren que una resección tumoral “total” o casi completa, por encima del 75-80% del volumen tumoral, podría asociarse con un beneficio en términos de supervivencia y evolución de estos pacientes.^{27,28} En resumen, y a pesar de que no existen datos concluyentes al respecto, el objetivo principal para la mayor parte de los profesionales implicados consiste en alcanzar una extirpación tumoral máxima, preservando al mismo tiempo la funcionalidad neurológica. Este logro es sin duda más fácil de obtener mediante el empleo durante el acto quirúrgico de técnicas como el mapeo y la electroestimulación funcional, incorporadas a este ámbito en los últimos años.²⁹

En estrecha relación con lo anterior, en estos pacientes cobra especial relevancia el lugar o centro en el cuál se va a llevar a cabo la intervención quirúrgica. Parece claro que en hospitales que poseen amplia experiencia en este tipo de cirugías, la morbi-mortalidad postoperatoria es mucho menor.³⁰

Como ya se ha comentado previamente, el diagnóstico definitivo de una tumoración intracraneal implica indefectiblemente la realización de una biopsia y su posterior análisis por parte del patólogo del tejido tumoral.

La biopsia estereotáxica puede ser una alternativa válida para aquellos pacientes en los cuáles la resección completa no es factible, por ser el tumor irresecable o el enfermo inoperable. Éste es por tanto el mínimo procedimiento quirúrgico a llevar a cabo ante un paciente con una lesión intracraneal. La tasa de éxito diagnóstico de esta técnica está entorno al 96% y, en contrapartida, las complicaciones posquirúrgicas acontecen en aproximadamente un 6-8%. Su mortalidad se sitúa en torno al 1%.³¹

Datos recientes obtenidos por algunos grupos de investigación proponen el análisis del ADN tumoral circulante en LCR, obtenido mediante punción lumbar, como una alternativa útil y menos agresiva en este contexto. Estos interesantes resultados están sin embargo aún en fase de investigación y deberán ser correctamente validados.³²

En el contexto de la recidiva tumoral, el beneficio de una potencial cirugía de rescate está muy cuestionado. No existen aún estudios aleatorizados y las series retrospectivas, aunque muestran una mejoría sintomática inicial y un ligero aumento de la supervivencia libre de progresión (SLP), no aportan ninguna mejoría clara con respecto al tratamiento de soporte en términos de SG. Quizás esta opción podría ser una alternativa razonable para pacientes altamente seleccionados.³³

Radioterapia. A la vista del frecuente patrón de recidiva local que presentan los gliomas de alto grado, incluso tras llevar a cabo una cirugía inicial “ambiciosa”, es lógico plantear la posibilidad de añadir otras modalidades terapéuticas locorregionales que puedan mejorar los resultados obtenidos. Entre estas maniobras destaca el tratamiento con radioterapia (RT).

Existen al menos 3 estudios aleatorizados, llevados a cabo durante los años 70, que demuestran la utilidad del tratamiento adyuvante con RT en los gliomas de alto grado. Inicialmente se utilizó RT holocraneal a una dosis de entre 50-60 Gy. Estos protocolos demostraron un beneficio a favor de la RT en términos de SG, incremento de 29 semanas, en pacientes con GBM y una cirugía “subóptima” (biopsia). Esta aportación fue menor, solo 11 semanas, en el caso de emplearse dosis menores de irradiación y, por otra parte, no aumentaba con una dosificación superior a la referida.^{34,35,36} Como consecuencia de estos resultados la RT externa pasó desde entonces a ser un estándar de tratamiento para estos enfermos.

La técnica empleada actualmente administra esta dosis dividida en sesiones de entre 1,8 a 2 Gy diarios, durante unas 6 semanas de tratamiento, en el área correspondiente a la imagen tumoral de las secuencias potenciadas en T2 de la RMN preoperatoria, añadiendo un margen de seguridad de unos 2-3 cm. en el tejido circundante.³⁷ (Figs.5A y 5B)

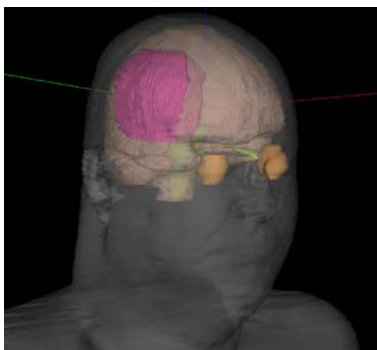


Figura 5A. Planificación de RT externa

Cedida por el Servicio de Oncología Radioterápica
(HUMV)

la incorporación de técnicas de braquiterapia, estereotaxia o radiocirugía. Los resultados disponibles con estas maniobras no arrojan aún, salvo en pequeñas series de pacientes muy seleccionados, ningún beneficio con respecto al tratamiento de soporte o sintomático.⁴⁷

Quimioterapia. El papel de la quimioterapia en estos tumores estaba clásicamente restringido a aquellos pacientes con recidivas tumorales, siendo su papel por tanto puramente paliativo.

Su utilidad en este tipo de tumores ha sido hasta hace poco muy cuestionada, fundamentalmente por la existencia de la denominada barrera hemato-encefálica (BHE) que, al menos teóricamente, podría impedir el acceso de los fármacos al lugar de asiento del tejido tumoral, el SNC. Además, la presencia de sistemas de “proteínas- bomba” como la glicoproteína P o la ABCG2, capaces de expulsar los fármacos fuera del SNC, es muy habitual en dicha localización.⁴⁸

Han sido muchos los fármacos testados hasta la fecha en este escenario clínico, inicialmente todos ellos en ensayos fase II (nitrosureas por vía sistémica o mediante dispositivos de “liberación local”, temozolomida, compuestos de platino, irinotecan, etopósido, procarbicina,...). La tasa de respuesta obtenida con el empleo de un agente único en todos los casos está situada en torno al 40% y la duración de la misma es de unos 6 meses, no habiéndose logrado específicamente con ninguno de ellos un mayor beneficio en términos de supervivencia y siendo estos logros perfectamente superponibles a los conseguidos por los esquemas de poliquimioterapia.⁴⁹

Hace ya tres décadas, comenzó a considerarse la posibilidad de utilizar estos tratamientos sistémicos, de forma combinada con la RT con intención adyuvante o complementaria tras una cirugía inicial.

El primer ensayo aleatorizado llevado a cabo con este planteamiento asignaba a pacientes con diagnóstico de GBM o AA, tras la cirugía, a uno de estos cuatro brazos: seguimiento, carmustina (BCNU), RT holocraneal o RT y BCNU concomitantes. La supervivencia media de los grupos que recibieron RT, con o sin BCNU, fue idéntica siendo en ambos casos superior al subgrupo de seguimiento (35 vs 14 semanas). En este estudio fue también valorada la supervivencia a “largo plazo” (18 meses) siendo superior en el brazo del tratamiento combinado (19 vs 4%).³⁶ Este avance, teóricamente atribuido al efecto beneficioso de la terapia concomitante, se confirmó en un segundo protocolo de investigación desarrollado por el mismo grupo de investigadores unos años más tarde, esta vez con BCNU o procarbicina.⁵⁰ Sin embargo, esta práctica quedará consolidada definitivamente como un estándar en base a los datos aportados por dos metanálisis que demuestran un incremento significativo en la supervivencia a uno y dos años (10.1 y 8.6% respectivamente). También se observa un aumento de unos 2 meses en la

supervivencia media de la población, en comparación con el empleo de la RT como única maniobra adyuvante, para los pacientes tratados con la combinación de QTy RT.^{51,52}

El siguiente paso consistió en explorar la utilidad de esquemas de poliquimioterapia, principalmente combinaciones de procarbina o cisplatino con una nitrosurea (BCNU) o hidroxurea, en este mismo escenario de concomitancia con la RT. Se han realizado varios estudios en este sentido arrojando éstos resultados poco concluyentes. En resumen, no se logra un incremento significativo en el tiempo a la progresión tumoral para el caso de los GBM.^{53,54} Por otro lado, los datos de un metanálisis con 2.100 pacientes incluidos dentro de estudios aleatorizados apuntan hacia la posible existencia de un efecto deletéreo de las combinaciones de QT en el contexto adyuvante en comparación con la monoquimioterapia.⁵⁵

Los últimos avances en este campo han llegado de la mano de la incorporación de un agente alquilante, la temozolomida (TMZ). Entre las principales cualidades de este fármaco destaca su excelente biodisponibilidad, cercana al 100%, lo cuál posibilita su empleo por vía oral. Además es liposoluble, motivo por el que es capaz de atravesar con relativa facilidad la BHE accediendo de esa forma al SNC.

Su utilidad se ha puesto de manifiesto principalmente tras conocerse los resultados definitivos de un ensayo multicéntrico fase III con más de 500 pacientes diagnosticados de GBM llevado a cabo por Stupp et al. En este protocolo, tras la cirugía inicial, los participantes eran aleatorizados a dos brazos de tratamiento: RT adyuvante (60Gy) o ese mismo tratamiento asociando TMZ (75mg/m²/día) de forma concomitante durante toda la RT. Posteriormente, en la rama experimental, los enfermos recibían seis ciclos más de tratamiento complementario con el mismo fármaco en monoterapia (150-200mg/m²/día, 5 días cada 4 semanas). Al final del periodo de seguimiento se obtuvieron diferencias significativas a favor del brazo de tratamiento combinado en cuanto a supervivencia libre de progresión (6.9 vs 5 meses), probabilidad de estar vivo a los 2 años (26 vs 10%) y supervivencia global (14.6 vs 12.1 meses).⁵⁶ Este beneficio asociado al tratamiento con el esquema de RT y TMZ postquirúrgicas, se ha confirmado posteriormente con un mayor tiempo de seguimiento.⁵⁷ Existen además datos procedentes de estudios fase II más pequeños que corroboran la utilidad de esta estrategia e incluso apuntan la posibilidad de que esquemas con dosis menores de TMZ, o de menor duración, podrían aportar resultados similares obteniéndose de este modo una importante disminución en la toxicidad.⁵⁸

Una cuestión a tener en cuenta es el hecho de que no todos los pacientes con GBM se benefician de igual forma del tratamiento adyuvante con QT. Por este motivo, se están realizando importantes esfuerzos por parte de la comunidad

científica para identificar marcadores que ayuden a optimizar el uso de estas terapias. Uno de estos posibles factores predictores de respuesta al tratamiento, sería la presencia en el tejido tumoral de una metilación de la región promotora del gen que codifica para un enzima denominado O6-metilguanin-ADN metiltransferasa (MGMT). Esta es una proteína que interviene en el proceso de reparación de los daños ocasionados por los agentes alquilantes sobre el ADN. Mediante este fenómeno epigenético tiene lugar una inhibición de la expresión de dicho gen, o lo que es lo mismo, una disminución en la producción de la MGMT y, consecuentemente, de la capacidad de las células para reparar el ADN. De este modo estas células serían, por decirlo de algún modo, más sensibles a la acción de los agentes alquilantes, obteniéndose al menos teóricamente en estos casos una mayor respuesta tumoral.^{59,60} Desde un punto de vista clínico, destacan los datos aportados por el análisis retrospectivo de esta característica genómica en los GBM de la subpoblación a estudio incluida en el brazo de tratamiento con TMZ dentro del ensayo de registro. La presencia de la metilación está claramente asociada a una mayor supervivencia libre de progresión (10,3 vs 5,3 meses) y global (21.7 vs 15.3 meses) en los sujetos portadores tratados con TMZ, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (HR 0.51). También, en este subgrupo, son más los pacientes vivos a los 2 años, hasta un 46%.⁶¹ Estos datos sugieren la existencia de una aparente capacidad predictora de respuesta, al menos a una terapia basada en TMZ, asociada con esta característica molecular.

Sin duda, esta información es de gran utilidad a la hora de plantear futuros ensayos que exploren de forma prospectiva este campo. De hecho, ya están en marcha varios protocolos que exploran la posibilidad de emplear esquemas de alta densidad de dosis con este mismo fármaco en pacientes que presenten esta peculiaridad molecular.

Otra alternativa terapéutica, aprobada dentro de este escenario clínico, es la implantación durante el acto quirúrgico de tabletas de liberación local controlada de carmustina (Gliadel®). Esta estrategia fue postulada inicialmente como de elección únicamente en caso de diagnosticarse una recurrencia tumoral. Sin embargo, un estudio aleatorizado, multicéntrico, “doble ciego”, con 240 pacientes (207 con GBM), parecía demostrar su utilidad, asociándose a la RT estándar, dentro del campo de la adyuvancia. La supervivencia media inicialmente reportada fue de 13.9 vs 11.6 meses a favor del grupo con Gliadel®, apareciendo también una mayor tasa de complicaciones locorregionales. Sin embargo este beneficio desapareció tras realizarse un mayor seguimiento de los pacientes.^{62,63} Con posterioridad otros grupos han intentado repetir la experiencia sin alcanzar un claro beneficio asociado con el empleo de estas tabletas por lo que se debe concluir que, a día de hoy, esta alternativa terapéutica no puede ser considerada un estándar.

A modo de resumen, se puede afirmar que actualmente el manejo estándar de los enfermos con un GBM comporta una estrategia multimodal que incluye una

cirugía inicial, tan “radical” como sea posible, seguida de una combinación de RT y TMZ concomitante, seguida de otros 6 meses de tratamiento con dicho fármaco en monoterapia.

Nuevas opciones terapéuticas. Parece evidente, a la vista de la supervivencia media de estos pacientes obtenida con los tratamientos actuales, la existencia de una necesidad de explorar nuevas opciones terapéuticas dentro de este campo.

Son múltiples las estrategias, tanto sistémicas como locorregionales, que han sido testadas a este respecto en los últimos años. Dentro de las primeras existen en la actualidad un gran número moléculas, fundamentalmente dentro de las denominadas “terapias dirigidas”, en fase de experimentación. Un ejemplo de éstas son los “oligonucleótidos antisentido” contra la proteinquinasa C o el IGF-IR, pertenecientes a las proteínas de membrana celular que intervienen en la regulación del ciclo de proliferación celular. Otros compuestos también testados son los fármacos dirigidos a inhibir la actividad de las farnesiltransferasas, piezas fundamentales dentro del mecanismo de activación de la vía mediada por Ras/MAPK, o las drogas inhibidoras de los factores de crecimiento como el EGFR o el PDGFR.

Desafortunadamente la mayoría de ellos están en etapas precoces, algunos incluso en fase preclínica, dentro de su desarrollo y presentan por tanto resultados que, aunque en ocasiones son esperanzadores, aún tienen poca consistencia.^{64,65,66,67,68,69}

Por otro lado las drogas antiangiogénicas como la talidomida, la suramina, los inhibidores de la proteinquinasa C beta (enzastaurin), los anticuerpos contra el HIF α o los fármacos dirigidos contra las MMPs (marimastat), familia de proteínas ligadas a la capacidad de invasión tumoral, también son objeto de estudio en este contexto.^{70,71,72,73}

De entre estos compuestos ensayados en estos enfermos con actividad antiangiogénica, destacan los resultados reportados en los últimos años con bevacizumab. Este anticuerpo monoclonal antiVEGF representa la única alternativa aprobada por la agencia americana del medicamento (FDA) para el tratamiento de las recurrencias en pacientes con GBM. Esta indicación se sustenta principalmente en el beneficio observado con el empleo de este anticuerpo en monoterapia o asociación con irinotecan, en los pacientes de ensayo clínico fase II aleatorizado, en términos de tasa de respuesta (TR) (28-38%), supervivencia libre de progresión (SLP) a los 6 meses (43-50%) y mediana de supervivencia global (SG) (9,2-8,7 meses).⁷⁴ A la vista de estos resultados, se iniciaron dos ensayos fase III aleatorizados y controlados con placebo en busca de demostrar la utilidad del bevacizumab añadido a la terapéutica estándar posoperatoria o en “primera línea”

con TMZ y RT. Desafortunadamente y a pesar de alcanzarse diferencias significativas a favor del grupo experimental en el tiempo a la progresión de esta población (10,6 / 10,7 vs 6,2 / 7,3 meses), la SG fue similar para las dos ramas de tratamiento. Estos datos han frenado la aprobación del fármaco en el contexto de primera línea, habiéndose incluso cuestionado a raíz de los mismos por parte de algunos autores su potencial utilidad a la recaída.^{75,76}

Otra vía experimental, mediante la cuál se ha tratado de combatir este tipo de tumores, la constituyen las terapias o agentes biológicos que tratan de estimular sistema inmunitario del huesped con el fin de que sea éste mismo el encargado de atacar a las células neoplásicas. Dentro de estos compuestos destacan el interferón alfa y beta, la interleuquina-2 (IL-2), los agentes virales o las vacunas antitumorales. Los resultados obtenidos por este grupo de terapias tampoco son definitivos.^{77,78,79,80,81}

La terapia génica, cómo en otros ámbitos de la medicina actual, es una opción al menos atractiva a considerar en los pacientes con neoplasias cerebrales. Las posibilidades dentro de este campo son casi infinitas ya que este tipo de tratamientos puede ser empleado tanto para estimular el sistema inmune del huésped, como para reemplazar genes dañados implicados en la génesis del tumor, incrementar la sensibilidad a los diferentes tratamientos a emplear o incluso transfectar directamente a las células tumorales con virus “tumorocidas” como el VHS o diferentes tipos de retrovirus,...⁸²

Dentro de las opciones experimentales de manejo locorregional, destacan los logros obtenidos por las técnicas de radioinmunoterapia. La tenascina es una glicoproteína de la matriz extracelular que únicamente se encuentra expresada en los gliomas de alto grado, no apareciendo sin embargo en el tejido cerebral normal. La administración intracerebral de “radioinmunoconjugados” contra esta proteína ha sido objeto de varias tentativas experimentales, todas ellas fase II, consiguiéndose con esta intervención resultados cuando menos alentadores.⁸³

Pero sin ninguna duda, la novedad más trascendente en este sentido es la reciente aprobación por parte de la agencia reguladora americana (FDA) de un dispositivo, el NovoTTF®-100A System (Optune®), capaz de generar campos eléctricos alternantes de frecuencia intermedia (TTFields) (Fig. 6). Estos campos logran interferir el proceso de replicación de las células tumorales alterando el huso mitótico, induciéndolas así a entrar en apoptosis.



Figura 6. Sistema NovoTTF-100A

Tomada de <http://www.medgadget.com>.

El dispositivo ya fue aprobado en el año 2011 para su empleo como alternativa a la QT en pacientes con recidiva, por alcanzar dentro de un ensayo clínico aleatorizado, similares resultados en términos de supervivencia que otras alternativas como la QT, pero eso sí, a costa de un menor número de efectos secundarios.⁸⁴ Resultados más recientes aportados por un ensayo fase III que compara la adición o no de este dispositivo al periodo de TMZ de mantenimiento, tras la QT-RT, refieren un beneficio a favor de la rama experimental. Según este protocolo, la tasa de supervivencia a 2 años pasa del 32 al 48% ($p=0.0058$), la SLP de 4 a 7,1 meses ($HR:0,62$, $p=0.001$) y la mediana de SG de 15,6 a 20,5 meses ($HR: 0,64$, $p=0.004$).⁸⁵ Estos datos han llevado recientemente a la FDA a extender también su aprobación del NovoTTFTM-100A System a la primera línea de tratamiento de pacientes con GBM.⁸⁶

2.4 Pronóstico

La supervivencia media de estos enfermos a pesar de recibir el mejor de los tratamientos disponibles, está situada en torno a los 12-18 meses. Dicho de otro modo, aún con el empleo de las modernas estrategias multimodales de tratamiento, la proporción de supervivientes a largo plazo, más allá de los 2 años, en este contexto clínico únicamente se ha incrementado en las últimas décadas de menos de un 5% hasta en torno a 15-25% según las series más optimistas.^{56,87}

Los principales factores pronósticos para la supervivencia en cualquier tipo de tumor cerebral son, la edad, el estado general (*“performance status”*, PS o KPS) y el grado tumoral (I a IV de la OMS). Además, aunque con menor peso, influyen también la duración de los síntomas, el estado cognitivo del paciente al diagnóstico

(puntuación en el “*minimal score*” o MMS), el tamaño tumoral y, posiblemente, la resección completa de la tumoración.⁸⁸ Es llamativo el hecho de que aún no son muchos los ensayos clínicos dedicados específicamente a analizar este aspecto.

Existe una clasificación pronóstica ya clásica aplicable tanto a GBM como a AA, el “*Recursive partitioning analysis*” (RPA), descrita inicialmente por el *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) americano y recientemente validada por la *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) (tabla II), que trata de combinar varios de estos factores en un intento de establecer diferentes categorías pronósticas.^{89,90}

Tabla II. Sistemas de clasificación pronóstica en GBM		
Clase RPA	RTOG (AA y GBM)	EORTC (GBM)
III	Edad < 50 años, AA, estado mental anormal. O Edad < 50 años, GBM, KPS 90-100	Edad < 50 años, GBM, PS 0-1
IV	Edad < 50, GBM, KPS < 90 O Edad ≥ 50, AA, KPS 70-100 ≤ 3 meses desde primer síntoma al inicio de tratamiento. O Edad ≥ 50, GBM, Buena función neurológica, resección quirúrgica completa.	Edad < 50, GBM, PS2 O Edad ≥ 50, GBM, MMS ≥ 27, resección quirúrgica.
V	≥ 50, GB, KPS 70-100 Función neurológica que impide trabajar. Resección parcial o solo biopsia con radioterapia al menos 54,4Gy O Edad ≥ 50, GBM, KPS < 70. Función neurológica normal.	Edad ≥ 50, GBM, MMS < 27, solo biopsia
VI	Edad ≥ 50, PS2, Estado mental anormal. O Edad ≥ 50, PS 0-2, GB, Biopsia y menos de 54.4 Gy de RT.	---

A día de hoy, no está aún claro cuál es el impacto pronóstico de las alteraciones genéticas descritas en estos tumores. En las algunas revisiones realizadas en torno a este asunto se ha observado que tanto las mutaciones de PTEN, como las alteraciones de cualquiera de los componentes de la vía de señalización relacionada con el gen Rb, parecen estar asociadas a una disminución en la supervivencia media de los enfermos con AA y GBM.⁹¹ Mientras, la

amplificación de EGFR sería en principio un marcador de buen pronóstico, o mayor supervivencia, en pacientes mayores de 60 años con diagnóstico de GBM. También previamente se ha mencionado el aparente buen pronóstico asociado con la presencia de mutaciones a nivel de los genes de la IDH-1/2 en estos tumores.¹⁴

Se han comparado asimismo de forma retrospectiva en algunos trabajos las características genéticas de los tumores de pacientes cuya supervivencia había sido superior a 3 años con las de otros con supervivencias menores de 18 meses. El subgrupo de mayor supervivencia presentó mayores niveles de expresión de MDM2 y p53, siendo la tasa de replicación tumoral menor en estos tumores.⁹²

Sin embargo, ninguno de los datos anteriormente enumerados se ha consolidado de forma definitiva como factor pronóstico en esta población de pacientes. No obstante, es importante reconocer que la relación entre estas anomalías y la evolución clínica del paciente es más compleja de lo que podría parecer en un principio, ya que se ha visto como el significado de estos marcadores genéticos puede variar con la edad del sujeto que desarrolla la neoplasia.⁹³

Es por tanto probablemente la suma de la existencia o no de alguno o varios de estos factores clínicos (características del huésped) y moleculares (características del tumor), junto con todas sus potenciales interacciones, la que quizás pueda ser capaz de aproximarse de una forma teórica más fiable a la evolución clínica real individualizada.

3. Sistemas inteligentes probabilísticos. Redes bayesianas

En las últimas décadas, se han desarrollado numerosas técnicas en distintas áreas de la inteligencia artificial para analizar y modelizar la gran cantidad de información disponible en numerosos problemas prácticos. El objetivo de estas técnicas de aprendizaje automático es preprocesar de forma rápida y fiable la información, capturando distintos patrones de conocimiento (reglas, grafos de dependencias, funciones, etc.) que sean apropiados para resolver un problema dado, y que resuman la información disponible haciéndola manejable. Se trata de que estos sistemas operen de forma objetiva y automática, precisando de la mínima intervención humana en los procesos de modelización e inferencia; la liberación de este tipo de tareas permite incrementar esfuerzos en trabajos más creativos como el diseño, supervisión e interpretación del sistema.

Durante los últimos años se ha producido un notable desarrollo de este tipo de herramientas en distintas áreas del conocimiento: aprendizaje automático (*machine learning*), computación neuronal, estadística, computación paralela, bases de datos, etc. En la última década se ha acuñado el término Minería de Datos (*Data Mining*) para referirse a este área interdisciplinar que extrae conocimiento de forma

automática a partir de un conjunto de datos.⁹⁴ Los sistemas resultantes se denominan sistemas inteligentes, o más genéricamente, sistemas expertos, pues permiten modelizar un problema, obtener conclusiones, e incluso tomar decisiones de forma casi automática.

La (Fig. 7) muestra el esquema general de un sistema inteligente con sus dos componentes principales: la base de conocimiento y el módulo de razonamiento. La base de conocimiento almacena de forma estructurada (utilizando algún patrón de conocimiento adecuado, como reglas, grafos, etc.) la información relevante para un problema dado. En los antiguos sistemas expertos, este conocimiento era obtenido de un experto humano. En los modernos sistemas inteligentes, este conocimiento se extrae directamente de los datos utilizando algoritmos de aprendizaje automático.⁹⁵

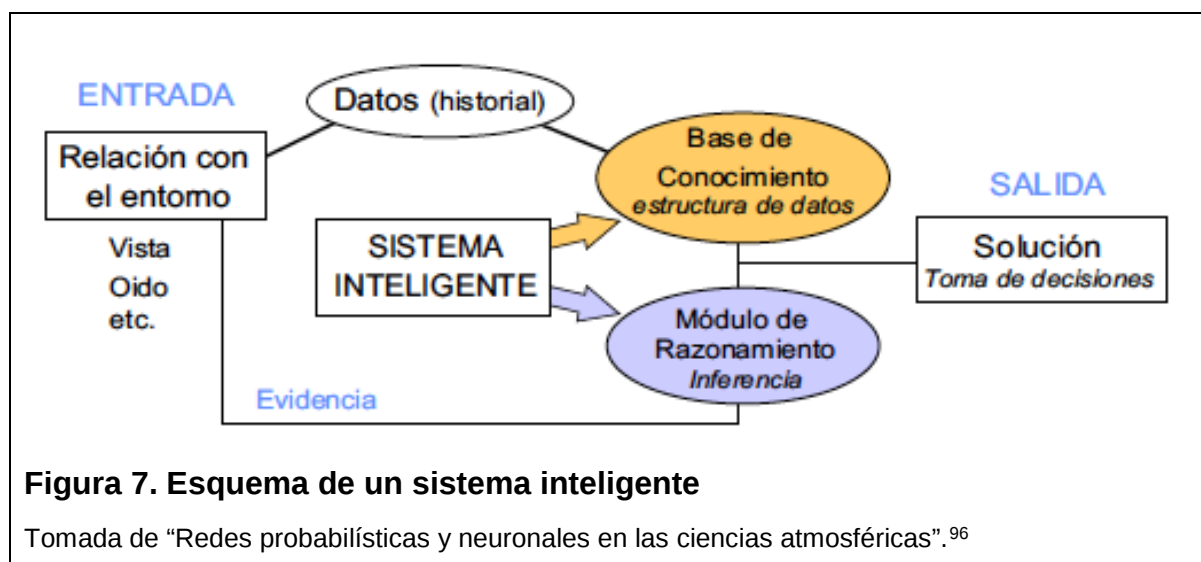


Figura 7. Esquema de un sistema inteligente

Tomada de "Redes probabilísticas y neuronales en las ciencias atmosféricas".⁹⁶

Por otra parte, una vez adquirido el conocimiento, el módulo de razonamiento ha de ser capaz de extraer las conclusiones apropiadas a partir de una evidencia concreta, por ejemplo, debe ser capaz de determinar el desenlace clínico de un paciente, a partir del valor ya conocido de ciertas variables clínicas en ese enfermo concreto, para un problema particular. El módulo de razonamiento está implementado en función del tipo de patrón de conocimiento empleado en el sistema. Por tanto, la forma de obtener conclusiones será distinta en cada caso. Por ejemplo, un sistema basado en reglas tiene un módulo de razonamiento que consiste en "disparar" aquellas reglas cuya premisa se conozca (forme parte de la evidencia), obteniendo las conclusiones indicadas en la regla, que a su vez pasarán a formar parte de la evidencia para tratar de seguir disparando reglas. En otros sistemas inteligentes más modernos, que utilizan patrones de conocimiento más abstractos, el proceso de razonamiento es más complicado y menos intuitivo.

Dos ejemplos notables de estas nuevas metodologías son los algoritmos inspirados en la Biología, como las redes neuronales, y los algoritmos de aprendizaje estadístico, como las redes probabilísticas.

3.1 Redes probabilísticas

Las redes probabilísticas combinan grafos y funciones de probabilidad para definir de forma eficiente modelos probabilísticos que contengan las relaciones de dependencia deseadas para un problema y que sean tratables computacionalmente.

La base de conocimiento de estos sistemas es una función de probabilidad conjunta (FPC) de todas las variables del modelo, mientras que el módulo de razonamiento implementa técnicas eficientes de cálculo de probabilidades condicionadas. Estos sistemas inteligentes basados en probabilidad, son fruto de un largo esfuerzo investigador para desarrollar modelos que permitan tratar problemas con incertidumbre que involucren un número elevado de variables. Estos modelos codifican de forma apropiada la probabilidad conjunta y las relaciones de dependencia entre las variables del problema, de forma que permiten calcular probabilidades marginales y actualizar éstas cuando se dispone de nueva información (evidencia):

- Por una parte, la base de conocimiento está dada en términos de probabilidades, a través de la FPC que cuantifica las relaciones inciertas entre las variables del problema.

- Por otra parte, el módulo de razonamiento lo constituyen los algoritmos de cálculo de probabilidades condicionadas, que permite obtener conclusiones a partir de información particular (o evidencia) conocida en un instante concreto.

Una ventaja de estos modelos es que tanto la estructura gráfica como las probabilidades (los parámetros del modelo factorizado resultante) pueden ser aprendidas directamente de los datos, con algoritmos de aprendizaje apropiados, y sin necesidad de supervisión humana. Por tanto, pese a su complejidad teórica, estos modelos son bastante intuitivos y fáciles de aplicar en situaciones prácticas.

Dependiendo del tipo de grafo utilizado (dirigido, no dirigido, mixto) y de la forma de codificar las relaciones de dependencia en el mismo, se tienen distintos tipos de redes probabilísticas. Las más famosas son las redes bayesianas (grafos dirigidos acíclicos) y las redes de Markov (grafos no dirigidos).⁹⁷

3.2 Redes bayesianas

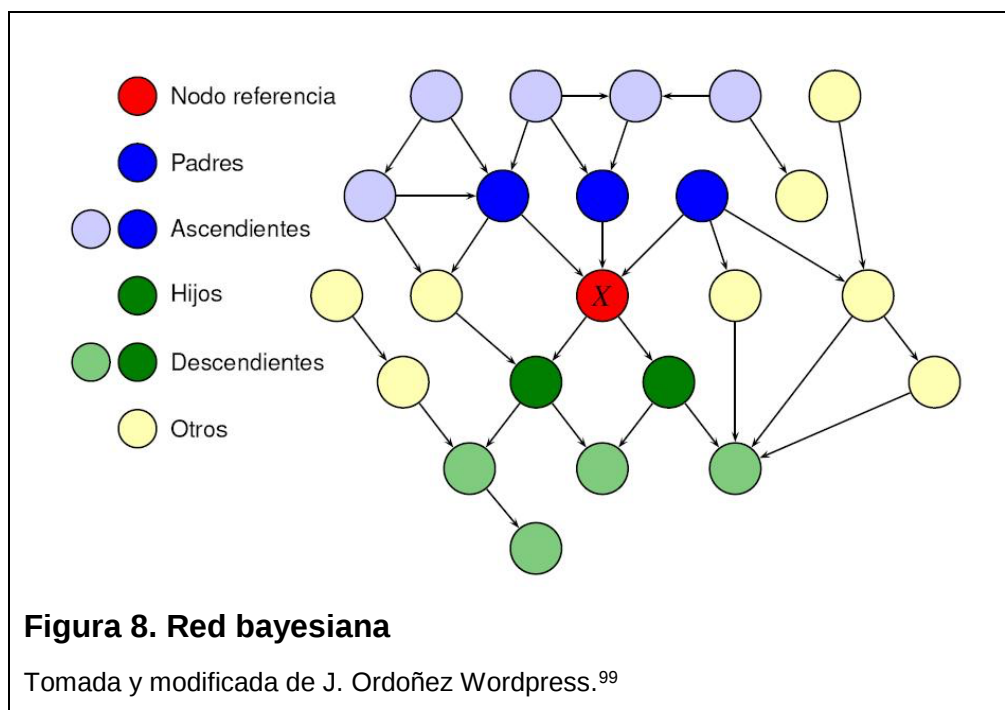
Una red bayesiana (RB) es un modelo probabilístico de una función de probabilidad conjunta (FPC) definido por un grafo dirigido acíclico (DAG) y un conjunto de funciones de probabilidad condicionada, de forma que la estructura de

dependencia/independencia mostrada por el DAG puede ser expresada en términos de la función de probabilidad conjunta mediante el producto de varias distribuciones condicionadas, como sigue:

$$p(x_1, x_2, \dots, x_n) = \prod_{i=1}^n p(x_i | \pi_i)$$

donde π_i es el conjunto de los padres del nodo x_i en el grafo, conjunto de nodos desde los que parte una flecha que termina en x_i .⁹⁸ De esta manera, las relaciones de independencia/dependencia del grafo son inmediatamente traducidas al modelo probabilístico de una manera muy práctica.

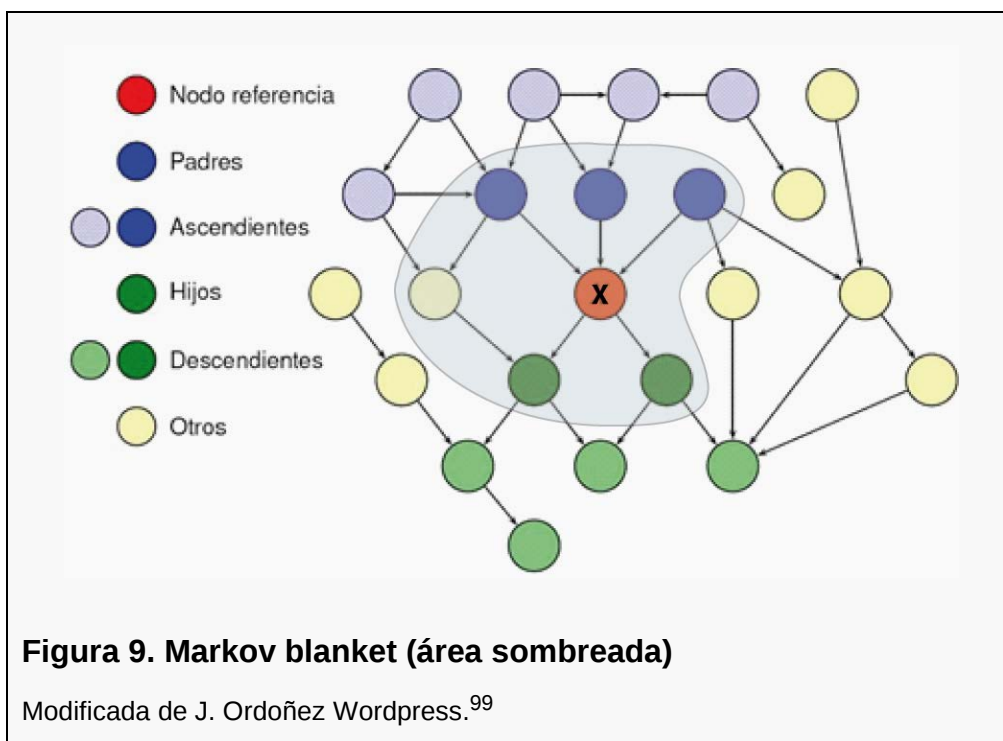
Los grafos recogen por una parte las variables o características de la población (nodos) y los unen en función de las relaciones de dependencia o independencia existentes entre todos ellos (líneas o flechas). Cada variable o nodo es dependiente de un conjunto de nodos (en ocasiones un nodo único) denominados padres y a su vez puede influir sobre otros nodos, hijos (Fig. 8). Cada nodo es independiente de sus no-descendientes dados sus padres. Es importante tener en cuenta que el hecho de que dos nodos se encuentren unidos entre si solo indica la existencia de una relación probabilística directa entre ambas variables, pero sin embargo el sentido marcado por las flechas no necesariamente expresa una relación causa-efecto entre dichas variables.



Una vez definido el grafo y la estructura de la FPC resultante, es necesario asignar un valor a los parámetros del modelo (es decir, a las distintas funciones de

probabilidad condicionada que definen la factorización). De esta forma se dota al modelo, por ejemplo, de la información necesaria para que sepa en que medida o cuánta un determinado nodo depende de sus padres. O dicho de otro modo, una vez especificado el modelo completo (grafo + FPC + parámetros), la utilidad de las redes probabilísticas consiste en hallar de forma eficiente la probabilidad de cualquier nodo (o conjunto de nodos), dada una cierta información (evidencia). Este proceso se denomina inferencia o razonamiento probabilístico y permite cuantificar la incertidumbre de las distintas variables y eventos del problema a medida que se va teniendo nueva información, o evidencia.

Un concepto de gran relevancia en este tipo de redes es el del *Markov blanket* de un determinado nodo o variable. El *Markov blanket* de una variable es el conjunto de variables que aísla completamente a dicha variable del resto de las variables incluidas en la red. Este conjunto está conformado por los padres, los hijos y otros padres de esos hijos, de dicha variable objetivo. Así una variable en una red bayesiana es condicionalmente independiente de las otras variables conocido el estado de su *Markov blanket*. La independencia condicional significa que cuando se conoce el estado del *Markov blanket* de una cierta variable X , añadir conocimiento de otras variables deja la probabilidad de X sin cambios. Este es un concepto importante porque el *Markov blanket* es el único conocimiento que se necesita para predecir el comportamiento de esa variable.¹⁰⁰ (Fig. 9)



Este tipo de modelos o sistemas están siendo cada vez más empleados en el campo de la biomedicina, y más concretamente en poblaciones con GBM, generalmente con la intención de analizar la gran cantidad de información genética

generada por las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación y tratar de sintetizarla. En definitiva tratando de crear modelos teóricos, “in silico”, de comportamiento clínico que puedan generar información predictiva o pronóstica a partir de datos clínicos y analíticos de pacientes, que contribuya a su vez a intentar optimizar la estrategia terapéutica a seguir en cada caso de una forma individualizada.^{101,102,103}

Dependiendo del carácter discreto o continuo de las variables, hay tres tipos de redes bayesianas:

- Redes bayesianas multinomiales . En ellas se considera que todas las variables son discretas, es decir, cada variable tiene un número finito de posibles estados. Asimismo se considera que la probabilidad condicionada de cada variable dados sus padres es multinomial y por tanto, queda especificada por la tabla de probabilidades correspondientes a las diferentes combinaciones de estados entre las variables implicadas.

- Redes bayesianas gaussianas . Se considera que las variables tienen una distribución normal multivariante continua.

- Redes bayesianas Mixtas. Incluyen ambos tipos de variables, discretas y continuas.

II. Descripción del proyecto

II. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

1. Hipótesis de trabajo

Los pacientes con GBM presentan evoluciones clínicas dispares a pesar de seguir pautas de tratamiento bastante homogéneas. Deben por tanto existir factores de índole clínico o molecular que justifiquen estas diferencias de comportamiento. Siendo esto así, sería deseable la existencia de herramientas o metodologías capaces de clasificar a estos enfermos en subgrupos pronósticos en función de dichas características.

2. Objetivos

1. Describir la población de pacientes con diagnóstico de GBM tratados en el servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla entre los años 2000 y 2010.

2. Tabular los resultados obtenidos con los tratamientos aplicados. Además, pormenorizadamente: a) analizar el impacto pronóstico de factores clínicos; b) investigar el impacto pronóstico de factores moleculares.

3. Comprobar el impacto de esos factores en dos subpoblaciones específicas: aquellos con resección completa frente a los pacientes tratados con resección parcial o biopsia.

4. Construir modelos matemáticos (sistemas inteligentes) capaces de clasificar a los enfermos en subgrupos pronósticos en base a su supervivencia y de identificar largos supervivientes.

III. Pacientes y métodos

III. PACIENTES Y MÉTODOS

1. Población incluída

Nuestra serie está conformada por pacientes con diagnóstico histológico de GBM atendidos de forma integral (cirugía, quimio y radioterapia,..) en nuestro centro, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, entre los años 2000 y 2010.

Para obtener estos casos se ha realizado una búsqueda en el registro de Anatomía Patológica del hospital, utilizando los términos “glioblastoma”, “gliosarcoma” o “glioma de alto grado”, entre los años previamente referidos. En una posterior revisión de estos diagnósticos se han excluido aquellos casos con diagnóstico definitivo distinto a GBM o gliosarcoma, como por ejemplo los astrocitomas anaplásicos.

Los datos y valores de las variables clínicas han sido recogidos a partir de la revisión retrospectiva de la información contenida en las historias clínicas de los enfermos.

Se han desechado también aquellos pacientes remitidos desde otras comunidades únicamente para ser intervenidos en nuestro centro, por no poder garantizarse una correcta recogida de la mayoría de las variables estudiadas y no disponer de datos fiables relacionados con los tratamientos posteriormente indicados o el seguimiento de estos enfermos.

2. Variables a estudio

Las variables analizadas en nuestro trabajo aparecen recogidas y descritas en las siguientes tablas:

2.1. Características de los pacientes

Se enumeran en la tabla III.

Tabla III. Caraterísticas de los pacientes			
Variable	Definición	Categorías	Unidades
Sexo	Sexo de los enfermos	- Hombre - Mujer	----
Edad	Edad de los pacientes	----	Años (media y rango)

Tabla III. Características de los pacientes (cont.)

Variable	Definición	Categorías	Unidades
Performance Status (PS)¹⁰⁴ al debut	Situación clínica del enfermo al diagnóstico	- PS 0 - PS 1 - PS 2 - PS 3 - PS 4	----
Tabaquismo	Hábito tabáquico al diagnóstico	- No fumador - Fumador de < 10 - Fumador de 10 – 20 - Fumador de > 20 - Exfumador (> 20 años)	Paquetes-años (pq-años) ¹⁰⁵
Enolismo	Hábito enólico al diagnóstico	- No bebedor - Bebedor de < 40 - Bebedor de 40 – 80 - Bebedor de > 80 - Exbebedor	Gramos de etanol al día (gr OH/día) ¹⁰⁶
Glioma previo	Existencia de un glioma de bajo grado previo	- Sí - No	----
Clínica al debut	Síntoma guía o dominante en el momento del diagnóstico	- Deficit neurológico - Cefalea - Crisis comicial - Déficit y cefalea - Déficit y crisis - Déficit y crisis y cefalea	----
Fecha de inicio de síntomas	Fecha de inicio de los síntomas referida por el paciente	----	----
Fecha de diagnóstico radiológico	Fecha de realización de primer test radiológico que detecta el tumor	----	----
Demora diagnóstica	Tiempo desde inicio de los síntomas hasta diagnóstico radiológico	----	Días

2.2 Características del tumor.

Están representadas en la tabla IV.

Tabla IV. Características de los tumores			
Variable	Definición	Categorías	Unidades
Localización	Localización anatómica en SNC	- Lóbulos temporales (izq/drcho.) - Lóbulos parietales (izq/drcho.) - Lóbulos frontales (izq/drcho.) - Lóbulos occipitales (izq/drcho.) - Gánglios basales - Multicéntrico	----
Tamaño	Diámetro máximo en TAC o RMN al debút	----	cm (media y rango)

2.3 Características del tratamiento

La tabla V muestra estas variables.

Tabla V. Características de los tratamientos utilizados			
Variable	Definición	Categorías	Unidades
Tipo de cirugía (IQ)	Cirugía realizada (criterio del cirujano)	- Biopsia - Resección parcial - Resección completa	----
Fecha de IQ	Fecha de la cirugía	----	----
Demora a cirugía	Tiempo desde diagnóstico hasta IQ	----	Días
Complicaciones postquirúrgicas	Morbimortalidad postquirúrgica	- Déficit neurológico - Hematoma - Infección - Crisis - Otros	----
Anticonvulsivantes	Fármacos antiepilépticos	- No pautados. - Difenilhidantoina (DFH) - Ácido Valproico - Otros	

Tabla V. Características de los tratamientos utilizados (cont.)			
Variable	Definición	Categorías	Unidades
Corticoterapia	Corticoide altas dosis	- No - Sí	----
Radioterapia (RT) externa	Tratamiento con radioterapia externa	- No - Sí	----
Fecha de inicio RT	Fecha de inicio de RT	----	----
Demora a RT	Tiempo desde cirugía hasta inicio de RT	----	Días
Implante QT	Implante de carmustina en el lecho quirúrgico	- No - Sí	----
Quimioterapia (QT) sistémica	Tratamiento con QT sistémica	- No empleada - Sí (Temozolomida)	----
Fecha de inicio QT	Fecha de inicio de tratamiento con QT	----	----
Demora a QT	Tiempo desde cirugía hasta inicio de QT	----	Días
Fecha de fin QT	Fecha de fin de tratamiento con QT	----	----
Emesis	Emesis máxima durante QT	- No - g.1 - g. 2 - g.3 - g.4	Escala NCI-CTCAE v3.0 ¹⁰⁷
Neutropenia	Neutropenia máxima durante la QT	- No - g.1 - g. 2 - g.3 - g.4	
Trombocitopenia	Trombocitopenia máxima durante QT	- No - g.1 - g. 2 - g.3 - g.4	
Otras toxicidades	Otras toxicidades g.3 o superior	- No - Sí	

2.4 Características a la recaída o progresión tumoral y evolución

Están resumidas en la tabla VI.

Tabla VI. Características a la recaída o progresión			
Variable	Definición	Categorías	Unidades
Recaída o progresión	Recaída o progresión tumoral (*)	- No - Sí	----
Fecha de la recaída o progresión	Fecha de la recaída o progresión (Rx o clínica)	----	----
PS a la recaída o progresión	Situación general del paciente a la recaída	- PS 0 - PS 1 - PS 2 - PS 3 - PS 4	----
Cirugía a la recaída o progresión	Rescate quirúrgico	- No - Sí	----
RT a la recaída o progresión	Reirradiación	- No - Radiocirugía - RT externa	----
QT de segunda línea	QT sistémica de segunda línea	- No - TMZ - Irinotecan - Irinotecan + bevacizumab - Sal de platino - Implante de Carmustina - Otros	----
QT de tercera y posteriores líneas	QT sistémica de tercera línea o posteriores	- No - Irinotecan - Irinotecan + bevacizumab - Sal de platino - Fotemustina - Otros	----
Muerte	Fallecimiento de paciente	- No - Sí	----
Fecha de muerte	Fecha de la muerte	----	----

(*) En función de si la cirugía inicial fue completa (recaída) o biopsia/parcial (progresión)

3. Estudios de patología molecular

3.1 Inmunohistoquímica

En nuestros casos las determinaciones serán llevadas a cabo en la muestra tumoral, parafinada, extirpada durante la intervención quirúrgica inicial y utilizada para realizar el diagnóstico.

Con vistas a uniformar y facilitar el desarrollo de las determinaciones de inmunohistoquímica (IHQ), se construirán varios *microarrays* de tejido (TMA) (Fig. 10). Para esta labor se empleará el dispositivo manual Becker Instruments Inc® MTA1-M2. Previa selección de forma conjunta con el anatomopatólogo de los bloques de parafina a estudiar, con este aparataje, fueron contruidos 4 TMA de 12 x 9 mm. que incluyeron las muestras de cada enfermo por duplicado junto a dos controles de tejido cerebral sano por cada *microarray*. De cada uno de estos se realizaron cortes de 5 micras de grosor sobre los cuales se llevó a cabo la técnica de tinción IHQ descrita en el (ANEXO 1), adjunto al final de esta tesis.

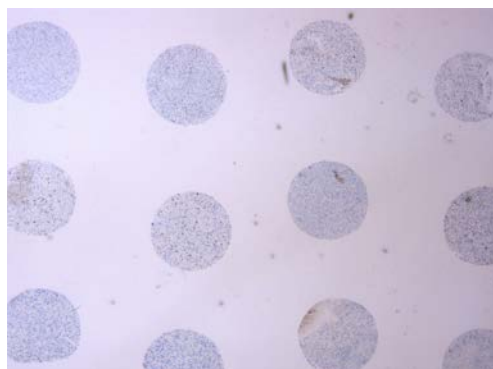


Figura 10. Fragmento de *microarray*

Se han tratado de escoger aquellas determinaciones de marcadores moleculares representativos de los principales receptores de membrana y vías intracelulares habitualmente alterados durante la génesis de estas neoplasias.

La tabla VII describe estas determinaciones, los anticuerpos utilizados, la interpretación de los resultados obtenidos y su potencial implicación en los procesos de oncogénesis:

Tabla VII. Características moleculares

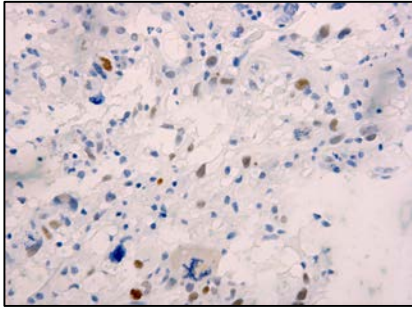
Determinación	Anticuerpo (*)	Técnica	Interpretación	Implicación en oncogénesis
p53	Dako Flex p53 protein MxH Clon DO-7 (IR 616)	Ready To Use 20 min Recuperación High	Patrón nuclear. (-) Ausente (+) <5% (++) 5-60% (+++) > 60%	Regulador de apoptosis. ¹⁰⁸
EGFR	Dako Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor Clone E30 (M 7239)	Dilución: 1/10 20 min Recuperación High	Patrón citoplasmático o membrana. (-) Ausente (+) <50% (++) >50%	Proliferación celular e invasión. ¹⁰⁹
pTEN	Dako Anti-Human PTEN Clone 6H2.1 (M3627)	Dilucion:1/100 20 min Amplificador Recuperación High	Patrón nuclear o citoplasmático. (-) <5% (+) 5-50% (++) >50%	Regulador de vías de proliferación celular. ¹¹⁰
p16	BD Pharmingen Anti-Human p16 (G175-405)	Dilución 1/50 20 min Amplificador Recuperación High	Patrón nuclear. (-) Ausente (+) <5% (++) 5-50% (+++) >50%	Regulador del ciclo celular. ¹¹¹
pRb	Abcam Anti-Retinoblastoma binding protein 6 antibody (ab55787)	Dilución: 1/100 20 min Recuperación High	Patrón nuclear. (-) <5% (+) 5-50% (++) >50%	Regulador de proliferación celular. ¹¹²

Tabla VII. Características moleculares (cont.)

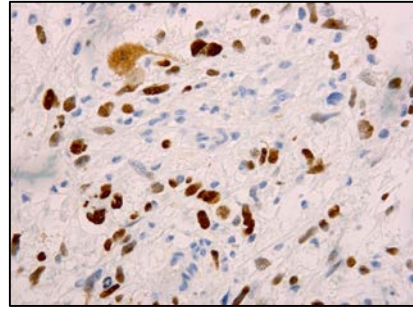
Determinación	Anticuerpo (*)	Técnica	Interpretación	Implicación en oncogénesis
Ki67	Dako Flex Ki-67, MxH, Clon MIB-1 (IR 626)	Ready To Use 20 min Recuperación Low	Patrón nuclear. (-) <10% (+) 10-50% (++) >50%	Indicador de proliferación celular. ¹¹³
CD105 (endoglina)	Dako Clon SN6h (M3527)	Dilución: 1/10 20 min Amplificador Recuperación High	Patrón de membrana Nº de vasos teñidos en muestra (microscopía óptica 20x)	Angiogénesis. ¹¹⁴
CD31 (PECAM-1)	Dako Flex CD31 Endothelial Cell MxH (JC70A)	Ready To Use 20 min Amplificador Recuperación Low		Angiogénesis. ¹¹⁵
MGMT	Chemicon International Anti- MGMT MT3.1 (MAB16200)	Dilución 1/150 30 min Amplificador Recuperación high	Patrón nuclear. (-) < 10% (+) > 10%	Enzima reparadora de ADN. ¹¹⁶

(*) Todos los anticuerpos empleados son de origen murino.

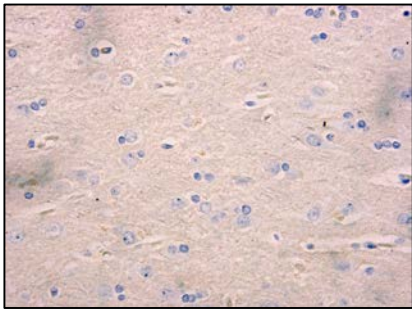
A continuación se muestran algunos ejemplos de los resultados más representativos obtenidos con las tinciones de IHQ (Fig.11):



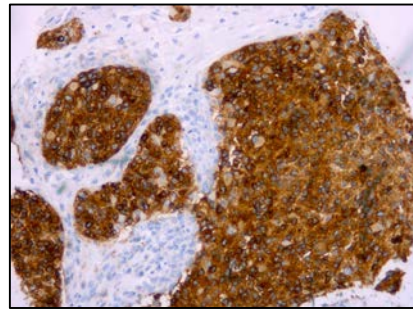
p53 (+)



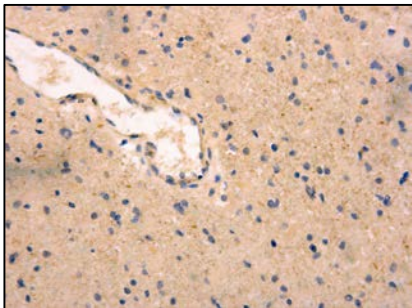
p53 (+++)



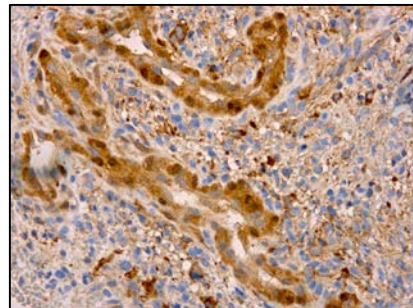
EGFR control (-)



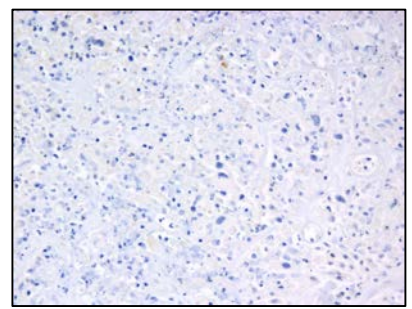
EGFR positivo (++)



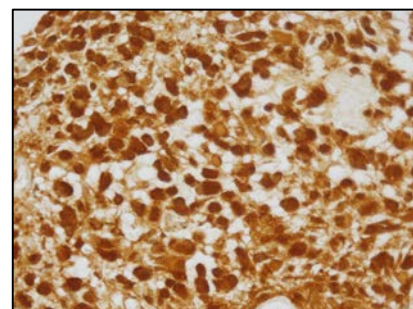
pTEN negativo (-)



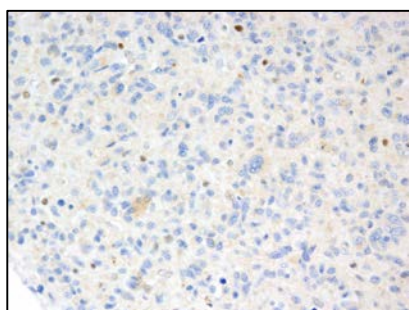
pTEN positivo (+)



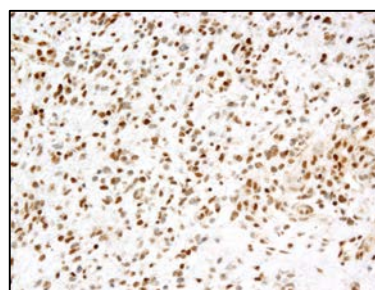
p16 (-)



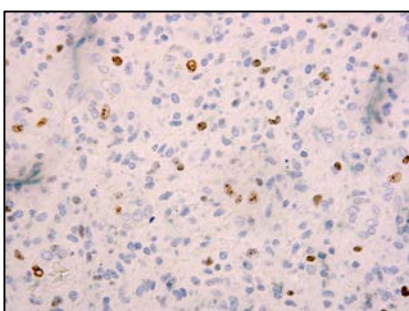
p16 (+++)



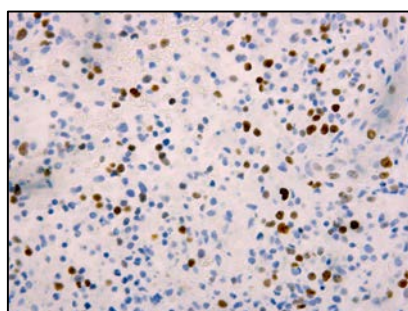
pRb (-)



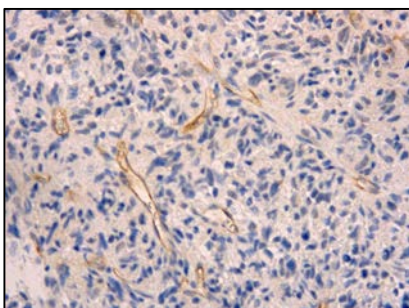
pRb (++)



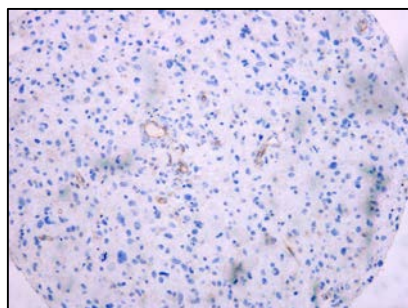
Ki67 (+)



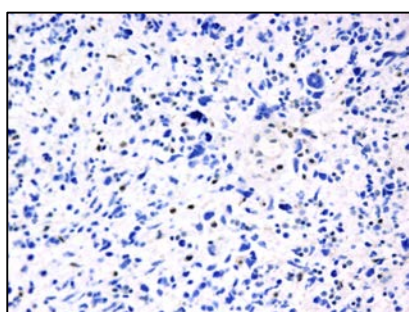
Ki67 (++)



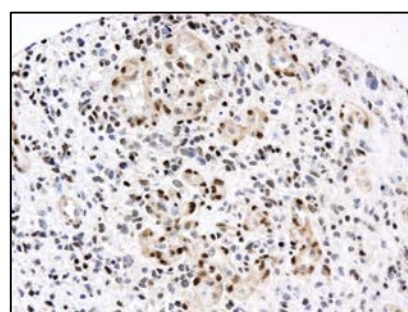
CD105 (endogлина)



CD31 (PECAM-1)



MGMT (-)



MGMT (+)

Figura 11. Determinaciones de inmunohistoquímica (IHQ)

Cada caso, contenido a su vez por duplicado en los TMA, ha sido evaluado por dos observadores (patólogo e investigador) y solo en caso de existir

discordancia en el resultado referido por ambos, se ha procedido a una tercera revisión conjunta de la tinción con el propósito de obtener un consenso.

3.2 RT-PCR para metilación del promotor de MGMT

La técnica escogida para determinar la presencia de metilación del promotor de MGMT en nuestro trabajo es la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) con enzimas de restricción. El kit empleado a tal efecto es el *OneStep qMethyl™* de Zymo Research.¹¹⁷ En comparación con los métodos habitualmente utilizados para este fin esta metodología, libre de bisulfitos, es más rápida y menos costosa ya que únicamente tiene paso o procedimiento. Con ello además también reduce la posibilidad de cometer errores.

Prevía extracción del ADN de las muestras tumorales parafinadas mediante un protocolo estándar al uso de *Cobas (Roche Diagnostic)*¹¹⁸ (ANEXO 2), este kit permite la detección de metilaciones a nivel de regiones específicas del ADN mediante la amplificación selectiva de las citosinas metiladas en las islas CpG del promotor del gen MGMT.

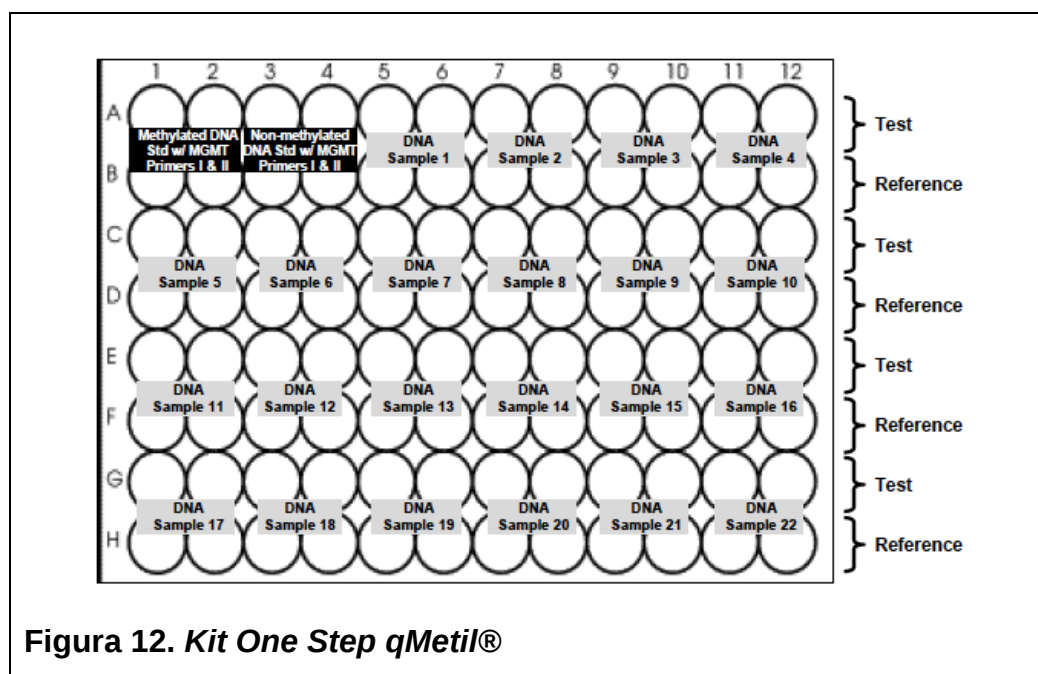


Figura 12. Kit One Step qMetil®

Inicialmente se divide el ADN a estudio en dos partes: una "reacción de prueba" y una "reacción de referencia" (Fig. 12). El ADN en la reacción de prueba se digiere con enzimas de restricción sensibles a metilación (MSREs) mientras que el ADN en la reacción de referencia no se lleva a cabo este proceso (*mock* digerido). El ADN de ambas muestras se amplifica usando PCR en tiempo real (RT-PCR) en presencia de SYTO® 9, un colorante fluorescente, y luego se cuantifica. Los valores umbral de ciclo (Ct) para las muestras de ensayo y del ADN de referencia variarán dependiendo del estado de metilación de las mismas.

Estas diferencias son característicamente mayores en el caso del ADN no metilado y serán posteriormente utilizadas para cuantificar posteriormente el estado de metilación en la muestra a estudio.(Fig.13)

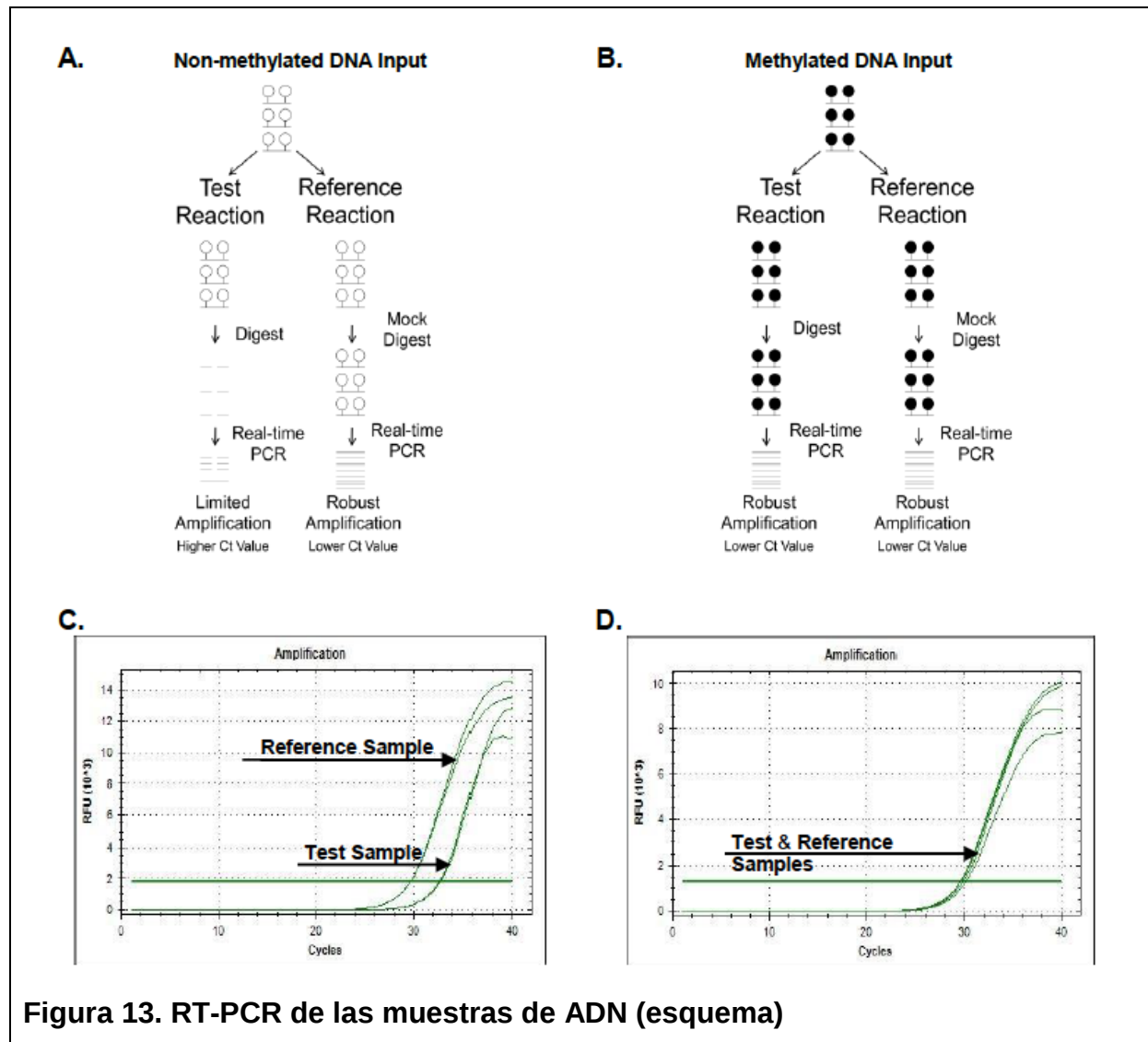


Figura 13. RT-PCR de las muestras de ADN (esquema)

El nivel de metilación para cualquier región amplificada se puede determinar usando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de metilación} = 100 \times 2^{-\Delta Ct}$$

Donde ΔCt = valor promedio de Ct de la reacción de prueba menos los de la reacción de referencia.

Cuando se emplea la PCR cuantitativa como técnica de estudio de metilación de ADN el punto de corte mínimo habitual para considerar este nivel como clínicamente relevante suele ser del 30%. Existen sin embargo autores que proponen un nivel del 50% en el caso de la metilación de los promotores de para poder asegurar la existencia de una interferencia o inhibición efectiva de la expresión

de dicho gen.^{119,120} La potencial utilidad pronóstica de ambos puntos de corte será explorada durante nuestro trabajo.

4. Análisis de supervivencia

Con la intención de intentar simplificar la interpretación de los resultados obtenidos por los análisis de supervivencia y además tratar de optimizar la información aportada por los casos clínicos disponibles en la serie estudiada, se dicotomizaron las variables exploradas en las que existían más de dos categorías para realizar estos cálculos.

La tabla VIII expone las equivalencias de las variables clínicas y moleculares previamente descritas, en formato dicotómico.

Tabla VIII. Variables dicotomizadas		
Variable	Categorías	Dicotómica
Edad	----	> o < 50 años > o < 60 años > o < 70 años
Performance Status (PS) al debut	- PS 0 - PS 1 - PS 2 - PS 3 - PS 4	- PS 0-1 - PS 2-3
Tabaquismo	- No fumador - Fumador de < 10 - Fumador de 10 – 20 - Fumador de > 20 - Exfumador (> 20 años)	- No Fumador / Ex /Fum < 10 - Fumador > 10
Enolismo	- No bebedor - Bebedor de < 40 - Bebedor de 40 – 80 - Bebedor de > 80 - Exbebedor	- No bebedor/Ex - Bebedor

Tabla VIII. Variables dicotomizadas (cont.)

Variable	Categorías	Dicotómica
Clínica al debut	- Déficit neurológico - Cefalea - Crisis comicial - Déficit y cefalea - Déficit y crisis - Déficit y crisis y cefalea	- Déficit neurológico - Otros
Demora diagnóstica	----	< o > 90 días
Localización	- Lóbulos temporales (izq/drcho.) - Lóbulos parietales (izq/drcho.) - Lóbulos frontales (izq/drcho.) - Lóbulos occipitales (izq/drcho.) - Gánglios basales - Multicéntrico	- Hemisféricos - Diencefálicos (ganglios basales) y multicéntricos
Tamaño	----	< o > Media de la serie
Tipo de cirugía (IQ)	- Biopsia - Resección parcial - Resección completa	- Bx / R. Parcial - R. Completa
Demora a cirugía	----	< o > Media de la serie
Complicaciones postquirúrgicas	- Déficit neurológico - Hematoma - Infección - Crisis - Otros	- No secuelas - Sí secuelas
Anticonvulsivantes	- No pautados. - Difenilhidantoina (DFH) - Ácido Valproico - Otros	- No - Sí
Demora a RT	----	< o > 42 días
Demora a QT	----	< o > 30 días

Tabla VIII. Variables dicotomizadas (cont.)		
Variable	Categorías	Dicotómica
PS a la recaída o progresión	- PS 0 - PS 1 - PS 2 - PS 3 - PS 4	- PS 0-1 - PS 2-4
RT a la recaída o progresión	- No - Radiocirugía - RT externa	- No - Sí
QT de segunda línea	- No - TMZ - Irinotecan - Irinotecan + bevacizumab - Sal de platino - Implante de Carmustina - Otros	- No - Sí
QT de tercera y posteriores líneas	- No - Irinotecan - Irinotecan + bevacizumab - Sal de platino - Fotemustina - Otros	- No - Sí
p53	(-) Ausente (+) <5% (++) 5-60% (+++)> 60%	- Negativo (- / +) - Positivo (++ / +++)
EGFR	(-) Ausente (+) <50% (++) >50%	- Negativo (-) - Positivo (+ / ++)
pTEN	(-) <5% (+) 5-50% (++) >50%	- Negativo (-) - Positivo (+ / ++)

Tabla VIII. Variables dicotomizadas (cont.)		
Variable	Categorías	Dicotómica
p16	(-) Ausente (+) <5% (++) 5-50% (+++) >50%	Negativo (-) Positivo (+ / ++)
pRb	(-) <5% (+) 5-50% (++) >50%	Negativo (-) Positivo (+ / ++)
Ki67	(-) <10% (+) 10-50% (++) >50%	Negativo (-) Positivo (+ / ++)
CD105 (endoglina)	Nº de vasos teñidos en muestra (microscopía óptica 20x)	< o > Media de la serie
CD31 (PECAM-1)		
MGMT (IHQ)	(-) < 10% (+) > 10%	Negativo (-) Positivo (+)
Metilación del promotor MGMT (RT-PCR)	< o > 30% < o > 50%	No metilado / Metilado No metilado / Metilado

4.1 Variables temporales

Todos los casos recogidos en este trabajo disponen de confirmación histológica de su GBM, conseguida mediante la exéresis quirúrgica de una muestra tumoral. La **fecha de dicha intervención** es tomada por tanto como referencia inicial para cuantificar todos los seguimientos y caracterizar los tiempos a recaída, progresión y muerte.

Se definen las siguientes variables temporales para realizar los análisis evolutivos:

- **Supervivencia libre de recaída (SLR)** (meses): Tiempo desde la cirugía con resección completa hasta constatación radiológica de reaparición tumoral o muerte.

- **Supervivencia libre de progresión (SLP)** (meses): Tiempo desde la cirugía con biopsia o resección parcial hasta constatación radiológica o clínica de progresión tumoral o muerte.

- **Supervivencia global (SG)** (meses): Tiempo desde la cirugía hasta última consulta, fallecimiento o pérdida de seguimiento.

4.2 Metodología estadística

Los análisis estadísticos en relación con los datos de supervivencia y la detección de potenciales variables clínico-moleculares con capacidad pronóstica en estos enfermos, se han llevado a cabo mediante la utilización del software SPSS de IBM® (versión 17.0) Para ello previamente se ha generado una ficha informatizada o registro para recoger y almacenar las variables y sus correspondientes valores en cada uno de los casos.

Los modelos y test estadísticos empleados son:

- Estimación de medianas de SLR ó SLP ó SG: **curvas de supervivencia de Kaplan-Meier**.¹²¹ Este test se emplea para estimar la probabilidad de supervivencia actuarial para las distintas variables de supervivencia analizadas: supervivencia global, supervivencia causa específica, supervivencia con órgano primario preservado y supervivencia libre de enfermedad. Estas técnicas permiten estimar la probabilidad de supervivencia o de cualquier otro evento temporal en un grupo de pacientes, incluso si están todavía vivos o su seguimiento es incompleto. Para elaborar cada una de estas curvas se manejan en cada caso dos variables, una de tiempo (el tiempo transcurrido desde el inicio hasta que sucedió el evento estudiado y si no ha sucedido, hasta el último seguimiento) y otra de estado (con tres posibilidades: que haya sucedido el evento -muerto-, que no haya sucedido -vivo-, o que se haya perdido el seguimiento -perdido-; en los casos con seguimiento perdido, el paciente si estaba libre de evento en el último seguimiento consta como vivo).

- Análisis univariante en busca de asociación de cada variable y medianas de supervivencia: **log-rank test (Mantel-Cox)**.¹²² Este método fue diseñado para detectar una diferencia entre curvas, cuya mortalidad en un grupo fuera consistentemente mayor que la correspondiente al segundo grupo, siendo la relación entre las mortalidades constante en el tiempo. La información que suministra es el resultado de la comparación entre dos o más curvas, considerando cada una de ellas en toda su extensión. Es el método más sensible de los desarrollados en la actualidad pues al contrario que otras pruebas detecta cualquier diferencia entre las distribuciones de supervivencia por pequeña que esta sea.

- Búsqueda de correlación entre variables: **test de Pearson, Spearman, chi-cuadrado o test exacto de Fisher** en función de las características cualitativas o cuantitativas de las variables estudiadas.¹²³

- Análisis multivariante en busca de asociación de múltiples variables e interacciones entre si y medianas de supervivencia: **modelo de regresión de Cox**.¹²⁴ Uno de los objetivos de este modelo consiste en cuantificar la relación entre supervivencia y las variables explicativas, para relacionar el efecto de cada covariable con la función de supervivencia. La prueba estima un juego de

coeficientes de regresión. Para estimar los coeficientes de regresión y el orden de importancia en las variables se ha empleado un procedimiento “paso a paso” condicional hacia delante con un nivel de entrada del 5%, de forma que las variables independientes van entrando en la ecuación de regresión de una en una hasta que esta es satisfactoria. El orden de inserción se determinó mediante el método de máxima verosimilitud (loglikelihood) en los factores pronósticos, que cuantifica la importancia de cada variable todavía no introducida en el modelo o ecuación de regresión. Por este procedimiento, la primera variable seleccionada es la más importante en predecir la supervivencia, la segunda es la segunda más importante y así consecutivamente. De esta forma el proceso suministra una selección y ordenamiento sucesivos de las variables independientes según su importancia relativa. Las distintas covariables deben ser dicotómicas y a cada una se le asigna un Riesgo Relativo, junto con un intervalo de confianza con una p menor o igual de 0,05. Cuando el riesgo relativo para una de las posibilidades de una covariable es menor de 1 es que el factor protege del evento, de forma significativa si su intervalo de confianza no llega a 1 y con más intensidad cuanto más se aleje de este valor, y si es mayor de 1 es que el factor lo es de mal pronóstico, de forma significativa si su intervalo de confianza no incluye el 1 y de nuevo con más intensidad cuanto más se aleje.

En todos los casos se consideran significativas las diferencias observadas si hay un p valor $< 0,05$. Siempre se han aplicado los test de forma bidireccional. Los intervalos de confianza calculados, son en todos los casos del 95%.

4.3 Modelos probabilísticos. Redes bayesianas

En nuestro caso, para generar estos modelos a partir de los datos clínicos y moleculares de los pacientes, se ha empleado el software Hugin (versión 8.2), uno de los programas comerciales más usados para la creación y desarrollo de redes bayesianas. Se utilizarán durante esta labor todas las variables estudiadas previamente en los análisis uni y multivariante en relación con la supervivencia de los enfermos en su forma dicotómica (tabla VIII, pag. 55) salvo para el caso de la edad y la SG (variable objetivo), que serán manejadas en forma de una sola variable con varias categorías (tabla IX):

Tabla IX. Categorización de variables para RB	
Variable	Categorías
Edad	< 50 años Entre 50 y 60 años Entre 60 y 70 años > 70 años
Supervivencia global (SG)	- SG < 12 meses - SG de 12 a 18 meses - SG de 18 a 24 meses - SG > de 24 meses

Este software utiliza ficheros texto plano en los que cada columna representa una variable y cada fila un caso, los datos están separados por comas. Por este motivo en nuestro caso concreto, en primer lugar, ha sido necesario transformar los datos recogidos en la tabla con formato SPSS a este tipo de formato.

Una vez preparados los datos, para poder generar la red se ha usado el algoritmo NPC para el aprendizaje estructural, es decir, generar el grafo a partir de los datos. El algoritmo NPC está especialmente indicado cuando se dispone de una muestra de datos pequeña. El grafo va a codificar todas las relaciones de dependencia/independencia entre las variables o nodos. Este algoritmo permite modificar parcialmente o corregir algunas de estas relaciones según su plausibilidad y en función de nuestro criterio experto, teniendo en cuenta que cada una de estas modificaciones puede dar lugar a nuevas asociaciones entre los nodos, todo ello con el fin de mantener íntegra la capacidad predictiva del modelo global.

Por último, una vez se ha definido la estructura de la red, o dicho de otro modo se ha conformado el grafo, es necesario estimar las tablas de probabilidad, aprender o entrenar el modelo. A partir de nuestra muestra, el algoritmo EM (Expectation Maximization) construye las tablas de probabilidad para cada uno de los nodos teniendo en cuenta las relaciones de dependencia/independencia definidas en el grafo (funciones de probabilidad condicionada), dotando así a la red de capacidad para predecir la probabilidad para cada uno de los estados de un nodo o variable concreta en función de la evidencia disponible (valor de las variables) para aquellos otros nodos cercanos o relacionados (padres, hijos...).

Cada RB se definirá fundamentalmente mediante la descripción de la conformación del *Markov blanket* correspondiente a la variable o nodo objetivo, en nuestro caso la SG.

Generaremos tres redes o modelos a partir de los datos de los pacientes incluidos en el total de la serie:

a) **Red clínico-molecular (Red total).** Incluye en el estudio todas las variables (relacionadas con las características clínicas de los enfermos al debut y a la recaída o progresión, los tumores, los tratamientos y las características moleculares de las neoplasias)

b) **Red clínica.** Solo incluirá las variables relacionadas con características clínicas de los pacientes al debut y recaída o progresión.

c) **Red molecular.** Como su nombre indica, incluye únicamente las características moleculares determinadas en las muestras tumorales.

Para intentar confirmar la “capacidad de generalización” (validez externa) de los modelos generados, se preservarán de forma aleatoria durante el proceso de creación de los mismos los datos correspondientes a 17 pacientes (10% de la serie) con el fin de que, una vez aprendido el modelo, estos valores sean utilizados como test “prospectivo” para comprobar la utilidad de dichas herramientas. Este proceso será llevado a cabo con la ayuda de un generador de números aleatorios consecutivos no repetitivos.¹²⁵

Además, mediante el mismo software con el que se realizará la generación de la RB, se simularán aleatoriamente dos series de casos virtuales, según características de la serie completa y de forma más específica solo con pacientes con RC, con el fin de aumentar el número de datos disponibles para realizar la validación y poder de este modo determinar de forma más fiable la capacidad teórica de cada modelo para clasificar adecuadamente a los enfermos de la serie y su tasa de acierto (precisión o exactitud) en el desempeño de esta labor.

Además, nos focalizaremos de nuevo en la tarea de intentar utilizar estos modelos para tratar de identificar a los largos supervivientes (SG mayor de 24 meses) en la serie global y en enfermos con resección completa. En este sentido se obtendrán datos referentes a la pericia de los modelos (AUC de la curva ROC), mediante la interpretación de las correspondientes tablas de contingencia o matrices de confusión y la generación de curvas ROC.¹²⁶

5. Subpoblaciones especiales. Análisis específicos

5.1 Pacientes con resección tumoral completa

Se consideran dentro de este subgrupo a aquellos enfermos en los que, según el criterio del cirujano, la resección tumoral practicada ha sido aparentemente completa, no hay tumor residual.

En esta población se consideran de especial interés aquellos casos con una SG superior a los 24 meses, denominados como “largos supervivientes”.^{56,127}

5.2 Pacientes con biopsia o resección tumoral parcial

Estos enfermos corresponden con los casos en los que únicamente se ha llevado a cabo una biopsia diagnóstica, guiada o no por estereotaxia, o la resección tumoral alcanzada ha dejado un residuo tumoral.

En todos los casos se tratará de identificar a estos individuos con una evolución especialmente favorable, mediante la construcción y utilización de un modelo matemático al uso compuesto por varias de las características clínicas o moleculares analizadas en este trabajo.

6. Consideraciones prácticas

Como ya se ha mencionado, los datos clínicos, los tratamientos administrados y resultados derivados del empleo de éstos, serán obtenidos a partir de la información contenida en las historias clínicas de los pacientes. Se observan en todo momento las cautelas oportunas respecto a la confidencialidad clínica.

IV. Resultados

IV. RESULTADOS

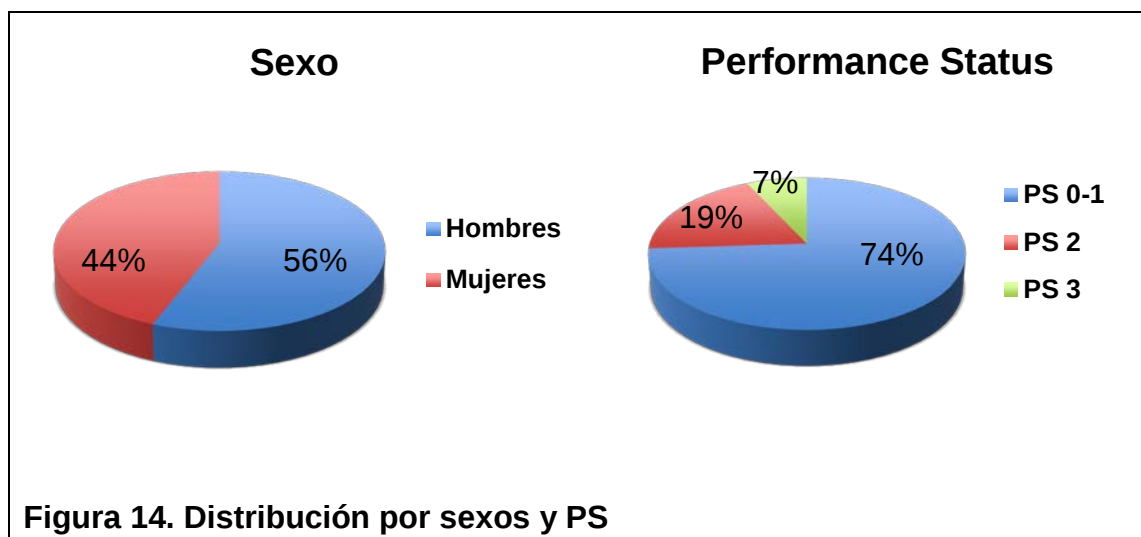
1. Características generales de la población

Entre los años 2000 y 2010 en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla han sido atendidos un total de 169 enfermos con diagnóstico histológico de GBM.

La distribución por sexos de esta población es de 56% (95) / 44% (74), hombres y mujeres respectivamente. La edad media al diagnóstico es de 60,9 años (28 - 82 años), siendo este parámetro similar para ambos sexos. En cuanto a su situación clínica inicial, un 74% (125) de los casos presentan un performance status (PS) de 0-1 en el momento del diagnóstico, mostrando PS 2 únicamente un 19% (32) y PS 3 un 7% (12). (Fig. 14)

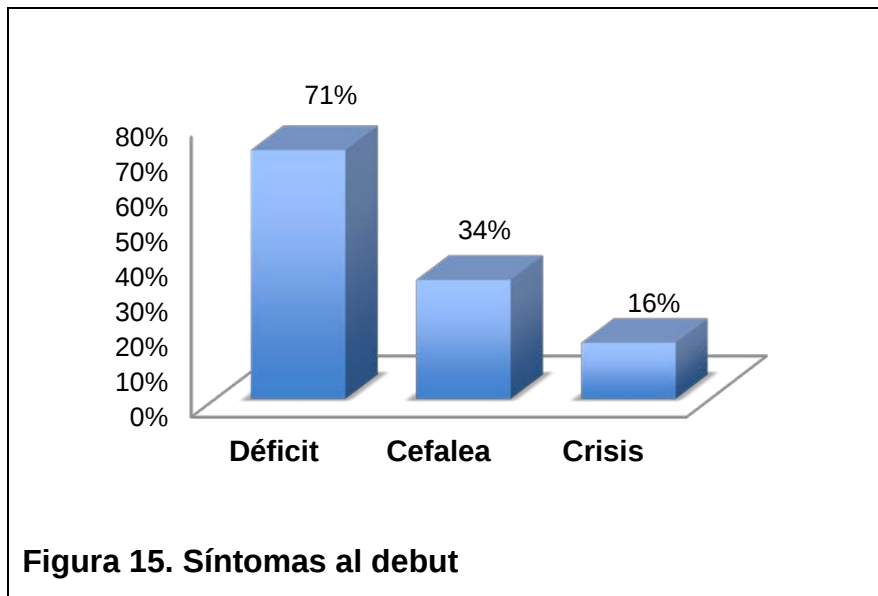
Un 64% (102) de los enfermos son no fumadores o exfumadores de hace más de 20 años. Hay en contraposición un 6% (10), 8% (13) y 22% (35) de pacientes fumadores activos en cuantía leve (menos de 10 paqs-años), moderada (10-20 paqs-años) o elevada (más de 20 paqs-años), respectivamente.

En cuanto al hábito enólico, un 77% (130) de los pacientes no beben o son exbebedores. Mientras, el 5 (9), 8 (13) y 6% (10) de los enfermos refieren una ingesta diaria de menos 40, de 40 a 80 ó más de 80 gr de etanol.



Un 2,3% (4) de los casos de GBM se han desarrollado a partir de la transformación de un glioma de bajo grado previamente diagnosticado.

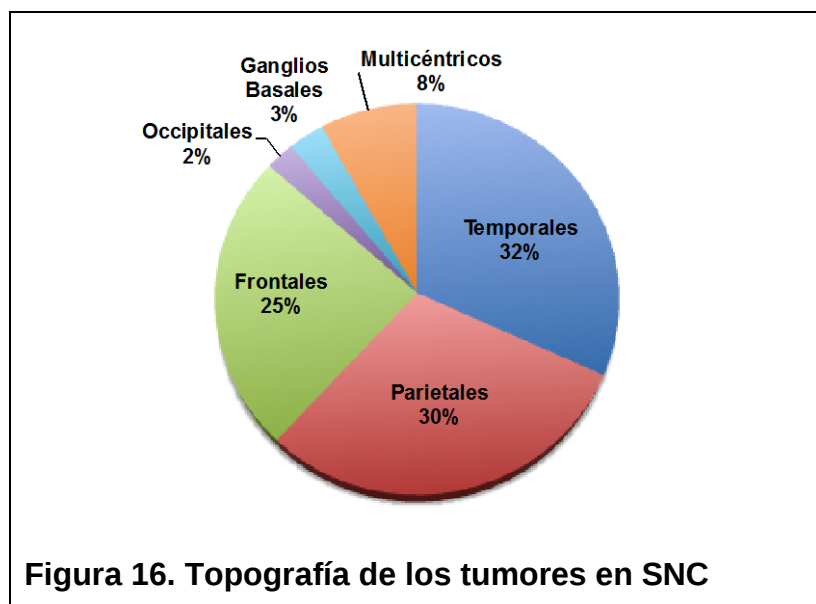
El debut clínico consiste en el desarrollo de un déficit neurológico (motor, sensitivo, deterioro cognitivo-conductual...) hasta en un 71% (116) de los casos, siendo éste síntoma exclusivo en un 52% (88) de las ocasiones al diagnóstico. Otros de los síntomas guía por orden de frecuencia, solos o en combinación con el anterior, son la cefalea 34% (58) y las crisis comiciales 16% (10). (Fig. 15)



El tiempo medio entre la primera manifestación clínica referida por el enfermo, muchas veces identificada “a posteriori”, y la detección “radiológica” del proceso fue de 43,9 días (0 - 361, desviación estándar (SD) 56,4 días).

Un 46,8 % (79) de los tumores se asientan en el hemisferio derecho y un 42,1% (71) en el izquierdo, con casi idéntica repartición entre los lóbulos frontales 24,9% (42), parietales 30,2% (51) y temporales 31,4% (53), y siendo menos frecuente su aparición en otros lugares como los lóbulos occipitales 2,4% (4), ganglios basales 3% (5) o en forma de tumores multicéntricos 8,3% (14). (Fig. 16)

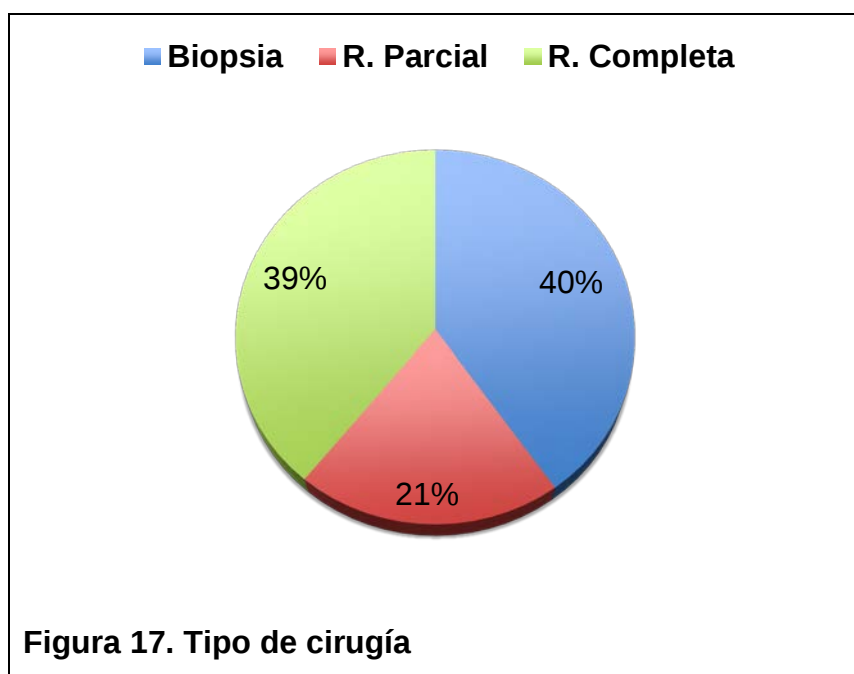
El diámetro medio de las lesiones, estimado mediante TAC y/o RMN, determinado en 113 casos, es de 4,3 cm (1 - 8).



2. Maniobras terapéuticas

a) Cirugía (IQ). En nuestro grupo de enfermos la biopsia estereotáxica exclusiva es el procedimiento indicado en un 40,2% (68) de las ocasiones. Mientras, la resección parcial o paliativa es de elección en un 20,7% (35), siendo finalmente posible el abordaje de intención radical o extirpación macroscópica aparentemente completa en el 39,1% (66) de los casos (Fig.17). Hay complicaciones postquirúrgicas hasta en un 28% (46) de los casos. Las de mayor frecuencia en esta serie son la presencia de déficit neurológico secundario a edema 11% (19), el desarrollo de un hematoma 14% (23) y con mucha menor frecuencia otras morbilidades como las infecciones o las crisis comiciales 1% (4). La mortalidad postoperatoria, en los 30 primeros días tras la cirugía, es del 10% (17) relacionándose en la mayoría de las ocasiones con alguna de las complicaciones previamente referidas y aconteciendo a su vez fundamentalmente en pacientes sometidos a biopsia, 65% (30) de los casos.

Los resultados de los test de correlación para el PS al diagnóstico y el tipo de cirugía realizada confirman una asociación significativa entre ambas variables (chi-cuadrado de Pearson $p < 0.001$). Este asunto será explorado con más detalle en próximos apartados.



En la línea del anteriormente mencionado intento de tratar de medir la rapidez de actuación en este contexto clínico, la demora media desde el hallazgo radiológico del tumor hasta la cirugía, es en nuestro medio de 19,6 días (0 - 150, SD 20,3 días). Más adelante valoraremos el potencial impacto de este valor en la evolución clínica del enfermo.

b) Terapia de soporte postoperatoria. El empleo de corticoides a altas dosis, 4 mg de dexametasona cada 6-8 horas, es universal. Los fármacos anticonvulsivantes se indican en un 72% (120), siendo la DFH la droga más frecuentemente utilizada para este fin, 61% (73).

c) Radioterapia (RT). La administración de RT externa postoperatoria, con la dosificación y volumen de irradiación estándar en este contexto, es utilizada hasta en un 63% de los enfermos en la serie global, alcanzándose un 88% en aquellos pacientes en los que se había obtenido una aparente resección completa del tumor. En contraposición, en la subpoblación sometida a biopsia o resección parcial esta herramienta terapéutica es empleada únicamente en un 47% de los casos.

De nuevo, en términos de demora terapéutica, el periodo medio entre la cirugía y la administración del tratamiento con RT es de 52,9 días (4 - 221, SD 31,8 días).

d) Quimioterapia tópica. La implantación en el lecho quirúrgico del tumor de un dispositivo de liberación tópica con carmustina (Gliadel®), cuando se ha logrado una resección completa, era considerada en ese tiempo un estándar de tratamiento para estos enfermos.⁶² Este procedimiento se ha llevado a cabo en el 15,4% (26) de nuestros pacientes.

e) Quimioterapia (QT) sistémica. La temozolomida (TMZ), como alternativa más consolidada dentro del tratamiento tanto complementario como paliativo de estos enfermos, ha sido utilizada en un 63% (107) de la cohorte global. En el caso concreto de su empleo tras una cirugía radical, con resección aparentemente completa, según el esquema de Stupp⁵⁶, o al menos inicialmente de forma concomitante con RT, un 64% (108) han recibido este fármaco.

La demora media de inicio para esta modalidad desde la fecha de la cirugía es de 33,9 días (4 - 207, SD 25,7), siendo este valor muy similar tanto para enfermos que reciben el tratamiento de forma complementaria tras la intervención, como en la cohorte tratada con intención paliativa tras una biopsia o resección parcial.

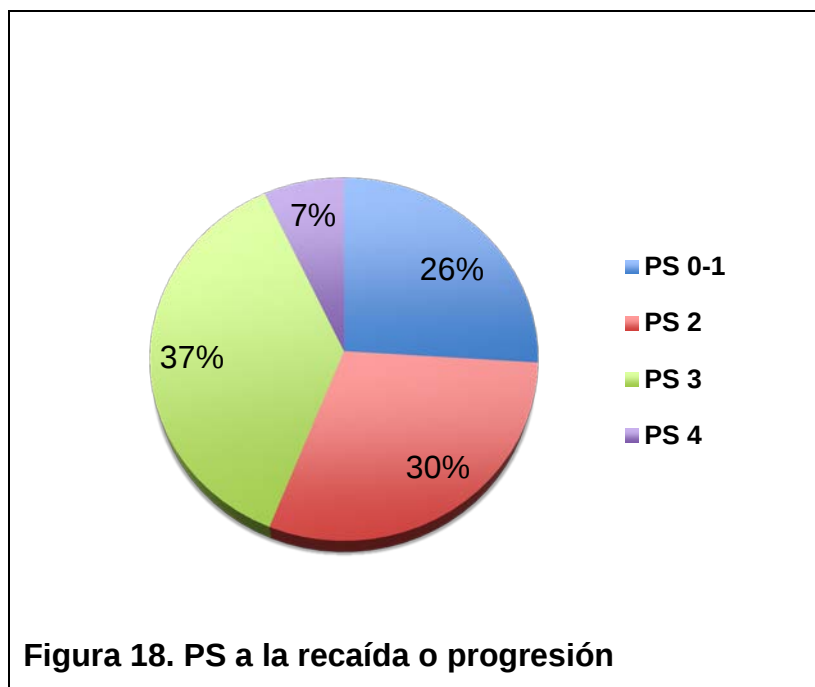
La duración media de la QT es de 3,7 meses (1 - 12, SD 2,5 meses), siendo ésta cifra ligeramente mayor en el grupo con tratamiento complementario 4,5 meses (1 - 8, SD 2,3 meses), que en aquellos pacientes con terapia paliativa 3,1 (1 - 12, SD 2,6 meses).

En cuanto a la toxicidad asociada con esta alternativa terapéutica, cabe destacar la existencia de un 9% (14) de emesis en grado moderado (g.2) y un 8% (13) de trombopenias graves (g.2 ó 3) y un 5% (8) de neutropenias (g.3) como efectos secundarios más destacables.

La tabla X resume la distribución de los tratamientos sistémicos utilizados en primera línea.

Tabla X. QT de primera línea		
Modalidad	Indicación (%)	Demora Inicio (días)
Gliadel®	15,4	--
RT externa	63	52,9
Temozolomida	63	33,9

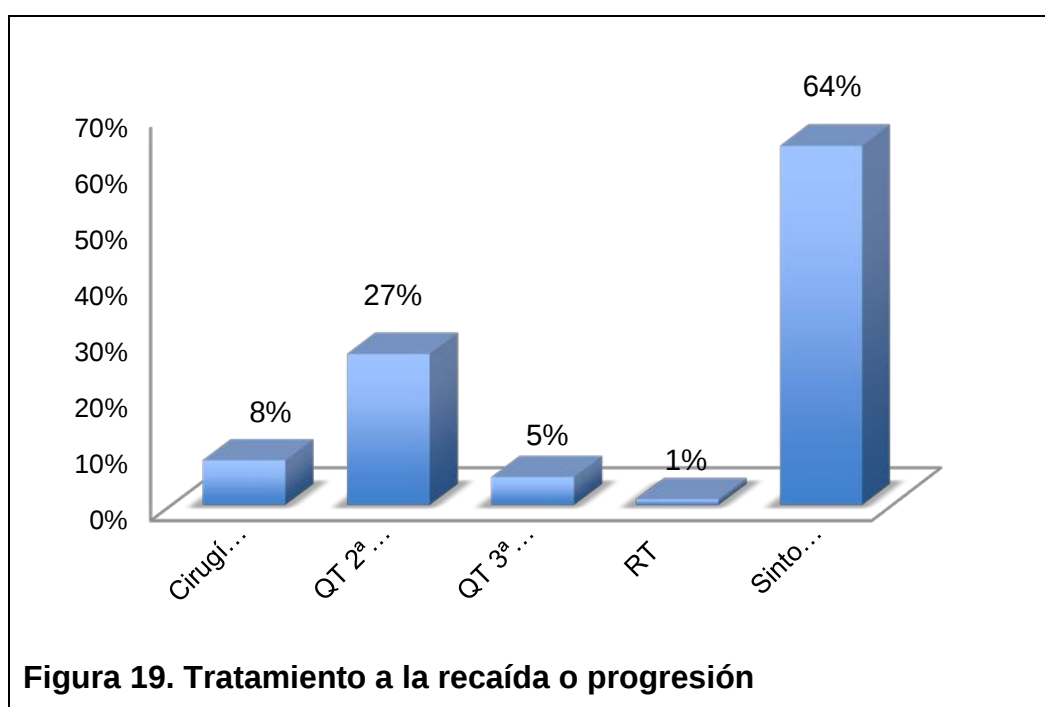
La recaída o progresión tumoral se evidencia durante el seguimiento en 168 de los 169 casos revisados. El estado general de los pacientes (PS) se ha deteriorado con respecto al inicialmente observado, conservando un 26% (43) de los enfermos un PS 0-1 en ese momento. El resto de enfermos presentan un PS2, PS3 ó incluso PS4; 30 (50), 37 (62) y 7% (11) de los casos respectivamente. (Fig. 18)



Considerando esta circunstancia es fácil justificar el hecho de que solo se haya planteado el rescate quirúrgico como alternativa factible en el 8% (14) de los pacientes. La “reirradiación” ha sido una opción de tratamiento anecdótica en este contexto, solo 1 enfermo se ha tratado con esta modalidad. Las terapias sistémicas utilizadas en 2ª y posteriores líneas quedan recogidas en la tabla XI:

Tabla XI. Terapia sistémica de 2ª y posteriores líneas		
Fármaco	n	(%)
TMZ	12	7
Irinotecan	24	14
Sal de platino	7	4
Bevacizumab	19	11
Fotemustina	2	1

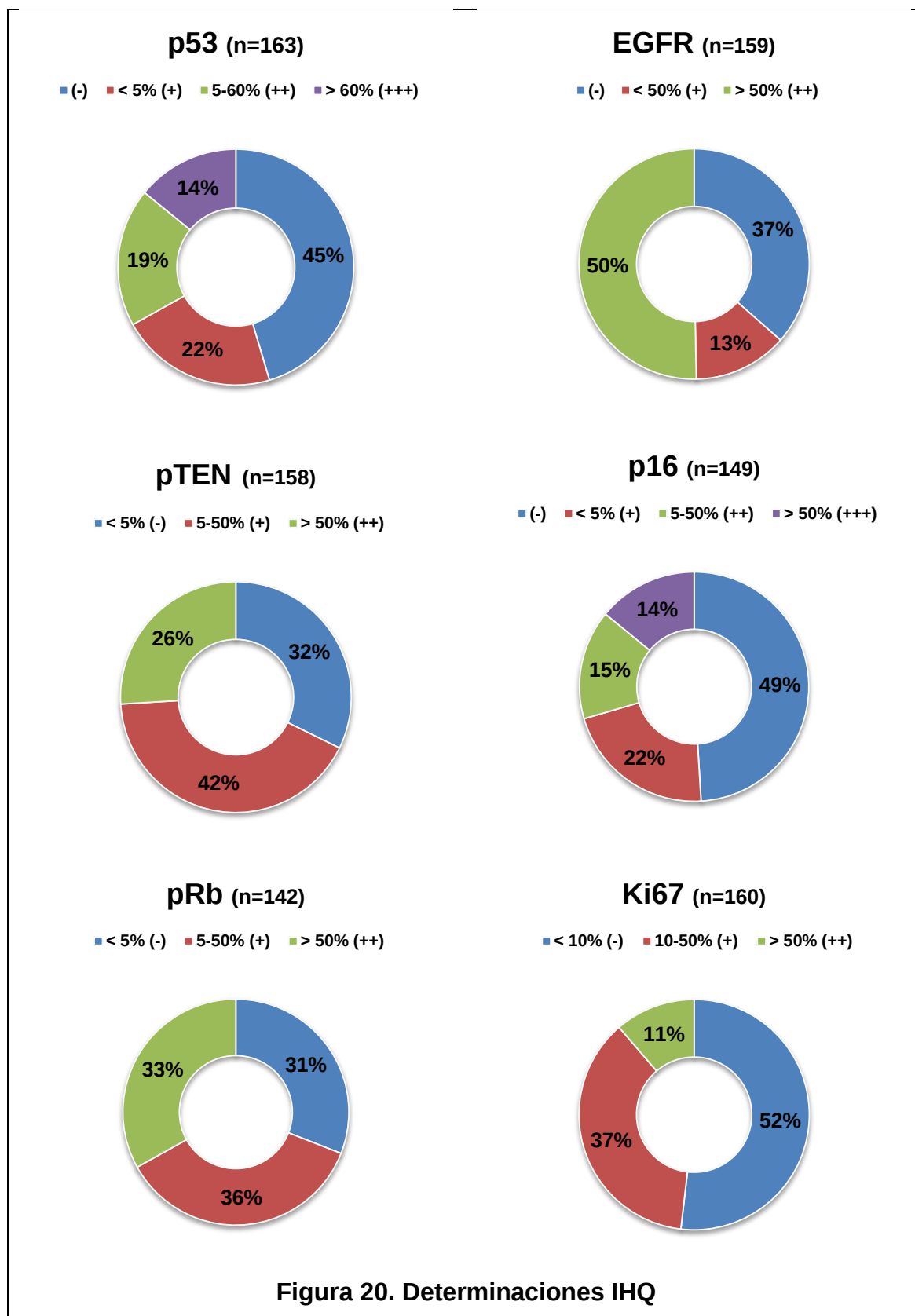
La (Fig. 19) resume las terapias empleadas tras la recaída o progresión tumoral:



3. Patología molecular

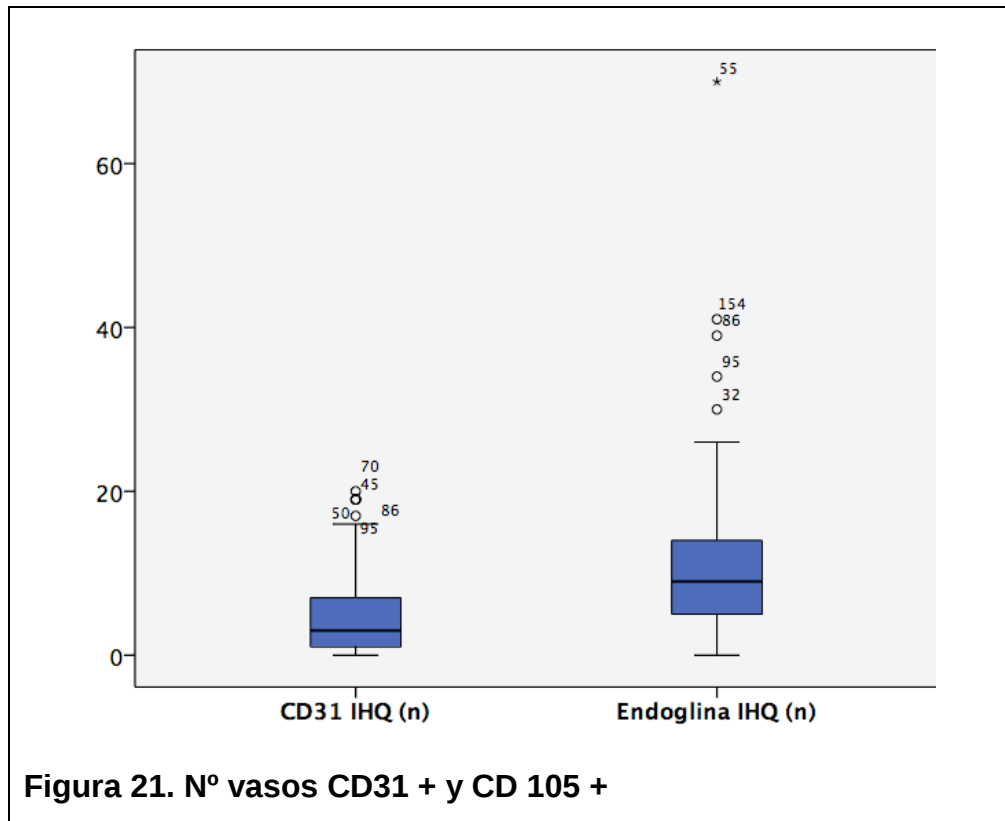
Debemos tener en cuenta la circunstancia de que en todas las determinaciones, dependiendo de la técnica, se han perdido entre un 3,5 (6) y un 16% (27) de los casos. Esta circunstancia se ha debido fundamentalmente a los artefactos producidos e inconvenientes sucedidos durante la manipulación de las muestras tumorales, la construcción previa de los TMA y el desarrollo de las técnicas (IHQ y RT-PCR). Por este motivo no se dispone de resultados en el mismo porcentaje de enfermos para todas las determinaciones.

Los resultados obtenidos tras llevar a cabo las tinciones de IHQ para valorar los niveles de expresión de diferentes proteínas implicadas en los distintos procesos oncogénicos que dan lugar a un GBM en las muestras tumorales de los enfermos incluidos en la serie, están representados en la (Fig. 20).



En cuanto al nº de vasos con tinción positiva para CD31 y CD105 (endogлина), ambos en principio relacionados con el concepto de densidad de microvasos (DMV)

del tumor, y por tanto con la neoangiogénesis, los valores medios observados son de 4,9 (0 - 20, SD 5,1) y 10,8 (0 – 70, SD 9,1) respectivamente. (Fig. 21)

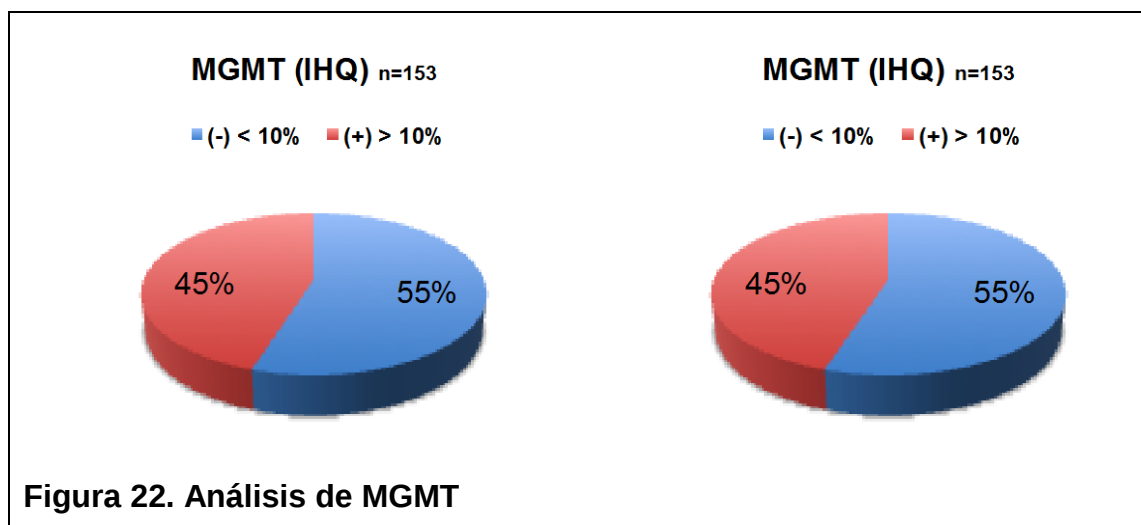


Se evidencia además una correlación significativa entre estas dos variables (test de Pearson $p < 0.001$); no existiendo sin embargo ningún tipo de asociación significativa entre ninguno de estos dos parámetros y el Ki67.

El estudio del gen MGMT y su producto transcripcional se ha realizado en este trabajo mediante dos técnicas diferentes. Por un lado se han medido los niveles de expresión de la proteína en las células tumorales mediante IHQ y además se ha llevado a cabo una determinación de los niveles de metilación del promotor de dicho gen, responsables de su potencial silenciamiento, mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR).

La RT-PCR cuantitativa, realizada en 144 muestras de la serie, detecta un nivel medio de metilación del promotor de MGMT del 47,1% (SD 40,9). Estableciéndose un punto de corte del 30%, habitual con esta técnica para los estudios de metilación de ADN mediante PCR cuantitativa, el 52% (75) de los tumores presentan metilación del promotor de MGMT y, por tanto, el 48% (69) serían de esta forma tumores no metilados.

La (Fig.22) resume los resultados de las determinaciones llevadas a cabo con ambas técnicas, IHQ y RT-PCR:

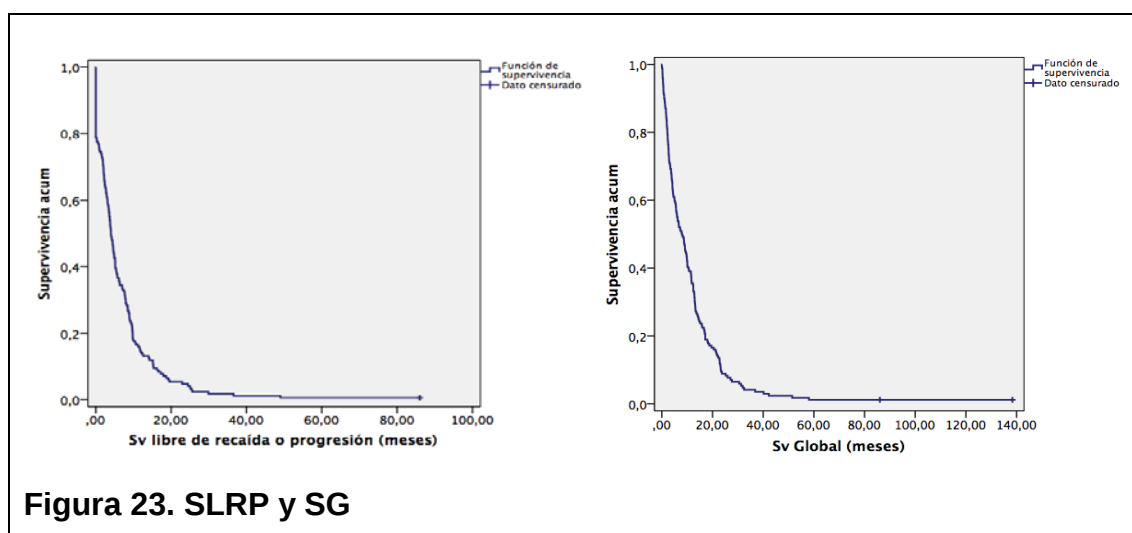


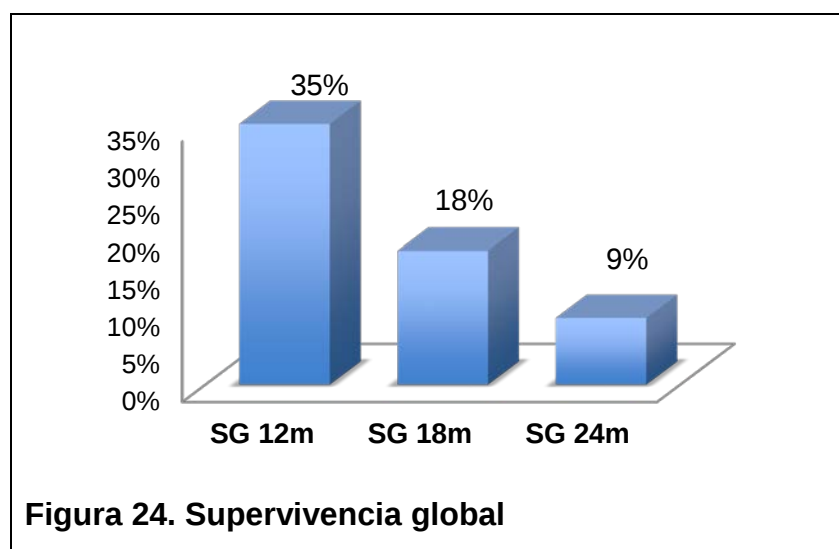
En los análisis de supervivencia, también realizados en este mismo trabajo, se explorarán además otros puntos de corte para estos niveles de metilación del promotor en busca de un valor óptimo con utilidad pronóstica.

4. Análisis de supervivencia

Con una mediana de seguimiento de 8 meses, de nuestros 169 enfermos, 168 han recaído y 167 han fallecido.

La mediana de supervivencia libre de recaída o progresión (SLRP) es de 4,01 meses (IC95% 3,2 – 4,8). La mediana de supervivencia global (SG) es de 7,9 meses (IC95% 5,5 – 10,4). Los porcentajes de supervivencia a 12, 18 y 24 meses son: 35, 18 y 9% respectivamente. (Figs.23 y 24)





4.1 Análisis de variables y SLRP

a) Análisis univariante.

Los resultados aparecen en las tablas XII a XV.

Tabla XII. Variables de los pacientes (SLRP)			
Variable	Mediana SLRP meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
Sexo			
- Hombre (95)	4,3 (3,4 – 5,1)	0,79 (ns)	No
- Mujer (74)	3,5 (1,5 – 5,4)		
Edad (años)			
< 50 (30)	5,5 (1,9 – 9)	0,053 (ns)	No
> 50 (139)	3,8 (<1 – 3,2)		
< 60 (79)	5,1 (3,7 – 6,6)	0,034	Sí
> 60 (90)	3,6 (2,9 – 4,3)		
< 70 (124)	4,8 (3,7 – 5,9)	< 0,0001	Sí
> 70 (45)	2,9 (1 – 4,8)		
PS			
0-1 (125)	4,9 (3,8 – 5,9)	< 0,0001	Sí
2-3 (44)	<1 (---)		
Tabaco (paqs-años)			
- No/Ex/<10 (112)	3,7 (2,9 – 4,5)	0,048	Sí
- Fuma 10-20/>20 (48)	7,9 (1,8 – 4,5)		

Tabla XII. Variables de los pacientes (SLRP) (cont.)			
Variable	Mediana SLRP meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
Alcohol			
- No/Ex (139)	4 (3,2 – 4,9)		
- Bebedor >40 (23)	4,2 (2 – 6,3)	0,13 (ns)	No
Glioma previo			
- No (165)	4,4 (3,5 – 5,3)		
- Sí (4)	2,1 (<1 – 5,5)	0,94 (ns)	No
Clínica Debut			
- Déficit (122)	3,8 (2,7 – 4,5)		
- Otros (47)	5,5 (2,9 – 8)	0,09 (ns)	No
Demora Dx (días)			
< 90 (150)	3,8 (3 – 4,7)		
> 90 (19)	5,2 (2,2 – 8,1)	0,3 (ns)	No

ns: no significativo

Tabla XIII. Variables de los tumores (SLRP)			
Variable (n)	Mediana SLRP meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
Localización			
- Hemisféricos (150)	4,4 (3,5 – 5,3)		
- Diencefálicos / Multi (19)	<1 (1,5 – 5,4)	0,007	Sí
Tamaño (cm)			
< 4,3 (58)	4,4 (3,3 – 5,5)		
> 4,3 (111)	3,8 (2,9 – 4,8)	0,317 (ns)	No

ns: no significativo

Tabla XIV. Variables relacionadas con los tratamientos (SLRP)			
Variable (n)	Mediana SLRP meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
Tipo de IQ			
- Bx (68)	2,1 (<1 – 3,2)		
- R. Parcial (35)	2,7 (1,2 – 4,2)		
- R. Completa (66)	7,8 (6,1 – 9,6)	< 0,0001	Sí
Demora a IQ (días)			
< 19,6 (116)	3,9 (3,1 – 4,8)		
> 19,6 (53)	4,4 (2,9 – 6)	0,22 (ns)	No
Secuelas de IQ			
- No (122)	4,7 (3,6 – 5,7)		
- Sí (46)	1,5 (<1 – 3,2)	0,002	Sí

Tabla XIV Variables relacionadas con los tratamientos (SRP) (cont.)			
Variable (n)	Mediana SLRP meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
Anticomiciales - No (48) - Sí (121)	2,7 (1,5 – 4) 4,9 (3,7 – 6,1)	0,04	Sí
RT externa - No (63) - Sí (106)	<1 (---) 7,4 (5,8 – 8,9)	< 0,0001	Sí
Demora a RT (días) < 42 (42) > 42 (64)	7 (3,8 – 10,3) 3,5 (2,5 – 4,4)	< 0,0001	Sí
Carmustina tópica - No (143) - Sí (26)	4 (3,1 – 4,9) 3,8 (2,7 – 5)	0,57 (ns)	No
QT sistémica - No (62) - Sí (107)	<1 (---) 6,4 (4,3 – 8,4)	< 0,0001	Sí
Demora a QT (días) < 30 (64) > 30 (43)	7,4 (4 – 10,7) 2,7 (1,5 – 4)	< 0,0001	Sí

ns: no significativo

Tabla XV. Variables moleculares (SLRP)			
Variable (n)	Mediana SLRP meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
p53 (-/+) (109) (++/+++) (54)	4,6 (3,5 – 5,7) 3,4 (2,5 – 4,4)	0,57 (ns)	No
EGFR (-) (58) (+/++) (101)	4,4 (3,3 – 5,6) 4 (3 – 5)	0,64 (ns)	No
p16 (-/+) (105) (++/+++) (44)	4 (3,1 – 5) 3,9 (1,6 – 6,2)	0,006	Sí
pRb (-) (44) (+/++) (98)	4,6 (<1 – 8,8) 3,7 (2,8 – 4,7)	0,42 (ns)	No

Tabla XV. Variables moleculares (SLRP) (cont.)			
Variable (n)	Mediana SLRP meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
pTEN (-) (51) (+/+/C) (107)	4 (3,2 – 4,8) 4 (2,9 – 5,1)	0,84 (ns)	No
Ki67 (-) (83) (+/++) (77)	4,6 (3,6 – 5,6) 3,5 (2,2 – 4,7)	0,44 (ns)	No
CD31 < 4,9 vasos (83) > 4,9 vasos (86)	3,8 (3 – 4,6) 4,9 (3 – 6,7)	0,01	Sí
CD105 (endoglina) < 10,8 vasos (78) > 10,8 vasos (91)	3,8 (2,8 – 4,8) 4,7 (3,3 – 6)	0,03	Sí
MGMT (IHQ) (-) (84) (+) (69)	4,2 (3,2 – 5,1) 4 (2,5 – 5,5)	0,87 (ns)	No
MGMT30 (RT-PCR) No Metilado (69) Metilado (75)	4,4 (3,4 – 5,5) 4,7 (2,9 – 6,4)	0,48 (ns)	No
MGMT50 (RT-PCR) No Metilado (86) Metilado (58)	4,7 (3,9 – 5,4) 3,6 (2,2 – 4,9)	0,2 (ns)	No

ns: no significativo

b) Análisis multivariante.

Se presentan en la tabla XVI los factores clínicos y moleculares que la regresión de Cox selecciona como asociados con la SLRP.

Tabla XVI. Análisis multivariante (SLRP)			
Variable	HR	IC95%	p valor
PS al diagnóstico (0-1) vs (2-3)	1,7	1 - 2,9	0,038
Demora diagnóstica < o > 90 días	0,4	0,2 - 0,8	0,010
Tipo de cirugía - Biopsia/R. Parcial vs R. Completa	0,5	0,3 - 0,8	0,003

Tabla XVI. Análisis multivariante (SLRP) (cont.)			
Variable	HR	IC95%	p valor
RT externa - No vs Sí	0,1	0,1 - 0,3	< 0,0001
Demora a QT - < o > 30 días	1,8	1,1 - 2,7	0,012
CD105 < vs > 10,8 vasos	0,6	0,4 - 0,8	0,005

4.2 Análisis de variables y SG

a) Análisis univariante

Los resultados se resumen en las tablas XVII a XXI.

Tabla XVII. Variables de los pacientes (SG)			
Variable (n)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
Sexo - Hombre (95) - Mujer (74)	8,6 (5,8 – 11,4) 6,2 (1,8 – 10,7)	0,77 (ns)	No
Edad (años) < 50 (30) > 50 (139)	11,8 (5,1 – 18,5) 6,7 (4,3 – 9)	0,089 (ns)	No
< 60 (79) > 60 (90)	11,4 (8,9 – 14) 5,6 (4 – 7,3)	0,032	Sí
< 70 (124) > 70 (45)	10,1 (7,3 – 12,8) 4,5 (2,8 – 6,1)	< 0,0001	Sí
PS 0-1 (125) 2-3 (44)	10,1 (7,8 – 12,3) 2,9 (1,5 – 4,4)	< 0,0001	Sí
Tabaco (paqs-años) - No/Ex/<10 (112) - Fuma 10-20/>20 (48)	6 (3 – 9) 11,7 (9,2 – 14,2)	0,22 (ns)	No
Alcohol - No/Ex (139) - Bebedor >40 (23)	8,6 (5,9 – 11,4) 8,7 (2,7 – 14,8)	0,06 (ns)	No

Tabla XVII. Variables de los pacientes (SG) (cont.)			
Variable (n)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
Glioma previo - No (165) - Sí (4)	8 (5,6 – 10,3) 2,8 (<1 – 13,1)	0,78 (ns)	No
Clínica Debut - Déficit (122) - Otros (47)	6,2 (3,7 – 8,7) 10,1 (6,3 – 14)	0,28 (ns)	No
Demora Dx (días) < 90 (150) > 90 (19)	6,7 (4,5 – 9) 15,9 (12,3 – 19,5)	0,26 (ns)	No

ns: no significativo

Tabla XVIII. Variables de los tumores (SG)			
Variable (n)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
Localización - Hemisféricos (150) - Diencefálicos / Multi (19)	8,9 (6,5 – 11,3) 2,3 (1,7 – 2,9)	< 0,0001	Sí
Tamaño (cm) < 4,3 (58) > 4,3 (111)	9,1 (5,8 – 12,4) 6,7 (4,2 – 9,3)	0,13 (ns)	No

ns: no significativo

Tabla XIX. Variables relacionadas con los tratamientos (SG)			
Variable (n)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
Tipo de IQ - Bx (68) - R. Parcial (35) - R. Completa (66)	3,7 (2,3 – 5) 5 (<1 – 9,4) 12,9 (11,9 – 13,8)	< 0,0001	Sí
Demora a IQ (días) < 19,6 (116) > 19,6 (53)	6,2 (3 – 9,5) 9,1 (7,4 – 10,8)	0,65 (ns)	No
Secuelas de IQ - No (122) - Sí (46)	9,9 (7,7 – 12,1) 2,7 (1,1 – 4,3)	< 0,0001	Sí
Anticomiciales - No (48) - Sí (121)	4,2 (2,3 – 6,1) 10,1 (7,7 – 12,4)	0,008	Sí

Tabla XIX. Variables relacionadas con los tratamientos (SG) (cont.)			
Variable (n)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
RT externa			
- No (63)	2,2 (1,6 – 2,7)		
- Sí (106)	12,8 (11,6 – 14,1)	< 0,0001	Sí
Demora a RT (días)			
< 42 (42)	12,3 (7,4 – 17,1)		
> 42 (64)	5,6 (3,8 – 7,5)	< 0,0001	Sí
Carmustina tópica			
- No (143)	6,7 (4,2 – 9,3)		
- Sí (26)	10,7 (6,1 – 15,4)	0,44 (ns)	No
QT sistémica			
- No (62)	2,3 (1,5 – 3,1)		
- Sí (107)	12,4 (11 – 13,8)	< 0,0001	Sí
Demora a QT (días)			
< 30 (64)	12,3 (9,2 – 15,3)		
> 30 (43)	5,2 (3,3 – 7,1)	< 0,0001	Sí

ns: no significativo

Tabla XX. Variables a la recaída o progresión (SG)			
Variable (n)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
PS a recaída o prog.			
0-1 (43)	16,8 (13,6 – 20)		
2-4 (123)	4,5 (3,2 – 5,8)	< 0,0001	Sí
IQ de rescate			
- No (154)	6,2 (4,1 – 8,3)		
- Sí (14)	22,2 (9,7 – 34,7)	< 0,0001	Sí
QT de 2ª línea			
- No (124)	4,2 (3,1 – 5,3)		
- Sí (44)	16,9 (13,6 – 20,1)	< 0,0001	Sí
QT 3ª línea y post.			
- No (159)	6,7 (4,4 – 9)		
- Sí (8)	18,2 (8 – 28,4)	0,026	Sí

ns: no significativo

Tabla XXI. Variables moleculares (SG)			
Variable (n)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Significación estadística
p53 (-/+) (109) (++/+++) (54)	8,9 (6,7 – 11,1) 5,5 (2,8 – 8,1)	0,97 (ns)	No
EGFR (-) (58) (+/++) (101)	8,7 (3,7 – 13,7) 8,2 (5,7 – 10,8)	0,59 (ns)	No
p16 (-/+) (105) (++/+++) (44)	8,2 (5,5 – 11) 6,7 (2,9 – 12,4)	0,06 (ns)	No
pRb (-) (44) (+/++) (98)	10,1 (5,2 – 15) 7,4 (4,3 – 10,4)	0,19 (ns)	No
pTEN (-) (51) (+/++/C) (107)	7,9 (4,9 – 10,9) 7,8 (4,4 – 11,2)	0,64 (ns)	No
Ki67 (-) (83) (+/++) (77)	8,9 (7 – 10,8) 5,9 (2 – 9,8)	0,74 (ns)	No
CD31 < 4,9 vasos (83) > 4,9 vasos (86)	5,6 (3 – 8,2) 9,1 (5,8 – 12,4)	0,018	Sí
CD105 (endoglina) < 10,8 vasos (78) > 10,8 vasos (91)	6,2 (3,7 – 8,7) 10,1 (5,8 – 14,3)	0,006	Sí
MGMT (IHQ) (-) (84) (+) (69)	7,8 (4,2 – 11,4) 8,7 (4,4 – 13,1)	0,77 (ns)	No
MGMT30 (RT-PCR) No Metilado (69) Metilado (75)	9,9 (6,5 – 13,3) 8,7 (5,7 – 11,7)	0,79 (ns)	No
MGMT50 (RT-PCR) No Metilado (86) Metilado (58)	9,9 (7,4 – 12,4) 6,6 (3,2 – 10)	0,08 (ns)	No

ns: no significativo

b) Análisis multivariante.

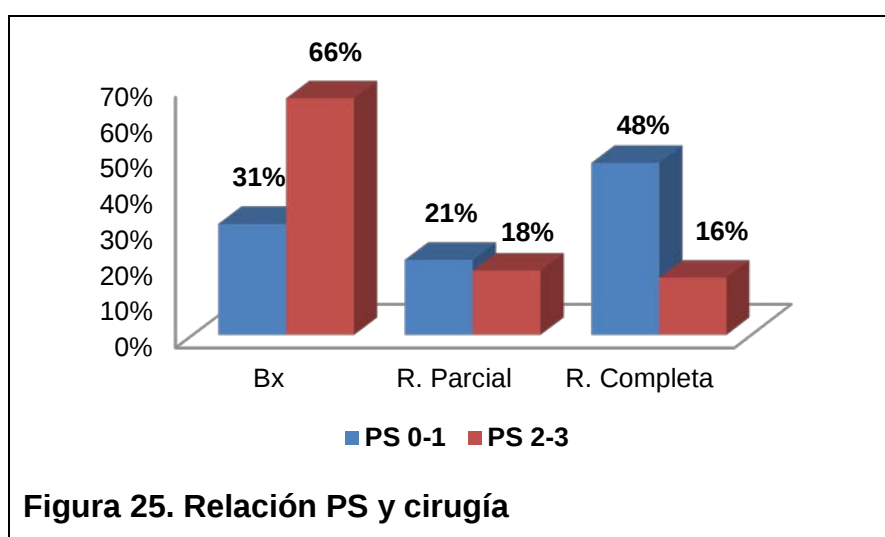
La tabla XXII muestra las variables clínicas y moleculares seleccionadas por el modelo de Cox para la ecuación como asociadas significativamente con la SG.

Tabla XXII. Análisis multivariante (SG)			
Variable	HR	IC95%	p valor
PS al diagnóstico (0-1) vs (2-3)	1,7	1 - 2,9	0,046
Localización - Hemisférica vs Diencefalo/Multicent.	2,2	1 - 4,5	0,031
Secuelas postquirúrgicas - No vs Sí	1,8	1,1 - 2,9	0,011
RT externa - No vs Sí	0,2	0,1 - 0,4	< 0,0001
Demora a QT - < o > 30 días	1,7	1,1 - 2,7	0,016
PS a la recaída o progresión (0-1) vs (2-4)	3,3	1,9 - 5,5	< 0,0001

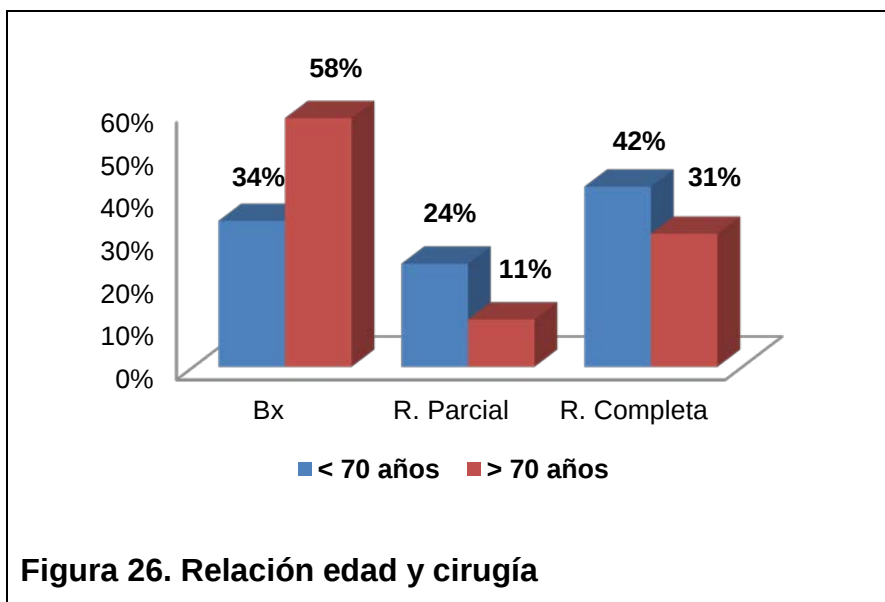
4.3 Asociaciones entre variables clínicas y tratamientos aplicados

Muchas de estas variables pueden tener asociaciones entre si. Pasamos a continuación a describir algunas de las más relevantes desde un punto de vista clínico.

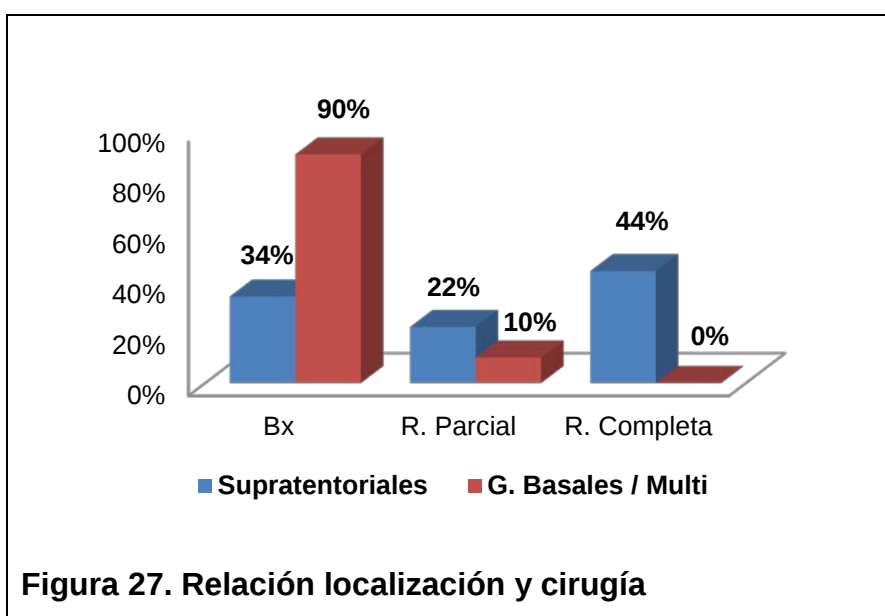
El PS presenta una relación significativa con el tipo de cirugía practicada (Fig.25), siendo así más frecuentes las biopsias como única tentativa de tratamiento quirúrgico en los enfermos con un peor estado general al diagnóstico (31% vs 66% en PS 0-1 vs 2-3; $p < 0,001$). Este mismo parámetro, aunque se no asocia con un incremento significativo de secuelas tras la cirugía (23% vs 38% en PS 0-1 vs 2-3; $p = 0,075$), si se correlaciona con una mayor mortalidad posquirúrgica (6% vs 21% en PS 0-1 vs 2-3; $p = 0,016$)



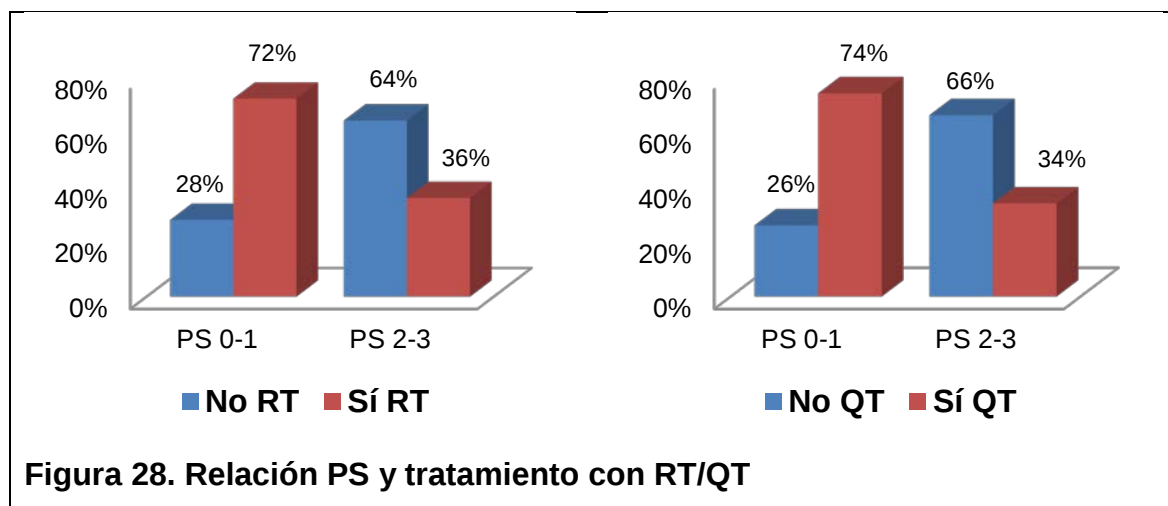
Para el caso de la edad, se observa correlación entre la población mayor de 70 años y la cantidad de biopsias practicadas (34% vs 58% en < 70 vs > 70 años; p 0,015) (Fig. 26). El resto de asociaciones anteriormente mencionadas para el PS no se cumplen en el caso de la edad independientemente del punto de corte.



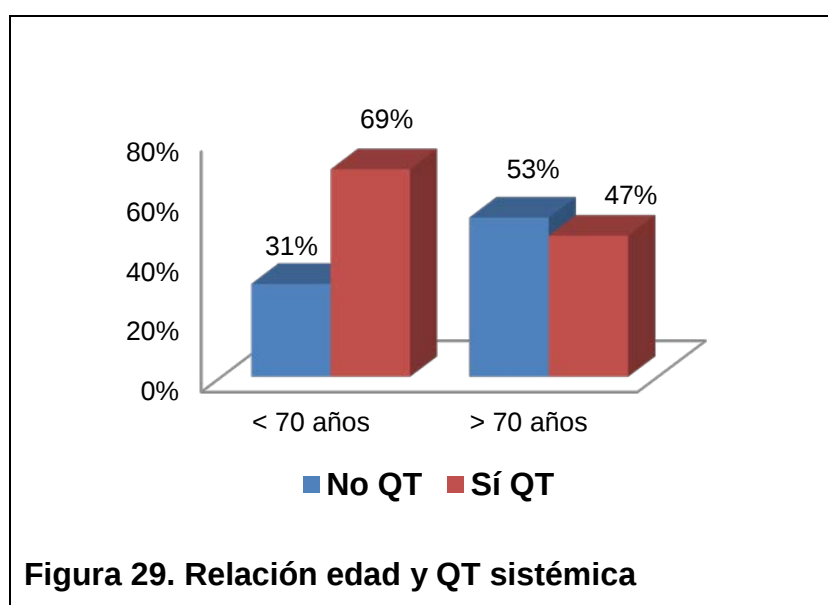
En cuanto a la localización tumoral, también existe una clara asociación entre dicho parámetro y el tipo de abordaje quirúrgico empleado. En los tumores de asiento en ganglios basales o de localización multifocal hay un predominio de las biopsias, indicadas en casi en un 90%, en contraposición con otras alternativas más ambiciosas. No ha sido posible alcanzar una resección completa en ninguno de estos enfermos. (Fig.27)



En relación con otras modalidades de tratamiento, los enfermos con mejor situación general al diagnóstico (PS 0-1), reciben con mayor frecuencia tratamiento con RT (72% vs 36%; $p < 0,001$) y QT (74% vs 34%; $p < 0,001$) que aquellos con una situación clínica subóptima en el debut (PS 2-3), (Fig. 28).



En cuanto a la correlación entre la edad y el uso de RT o QT, no se observa con puntos de corte de 50 y 60 años. Considerando un punto de corte de 70 años existe una asociación estadísticamente significativa entre la edad y el empleo de QT sistémica (no/sí), (31 / 69%) vs (53 / 47%), en menores o mayores de 70 años respectivamente ($p < 0,001$), que no existe para el caso de la RT. (Fig.29)



Finalmente, tras la recaída o progresión tumoral, el PS está íntimamente relacionado con la indicación de una cirugía de rescate, llevada a cabo exclusivamente en enfermos con PS 0-1, o con la utilización de QT sistémica en

segunda y sucesivas líneas, únicamente se administró en un 8% de enfermos con PS 2-4 en segunda línea.

5. Análisis de subpoblaciones

5.1 Pacientes con resección tumoral completa

De los 169 pacientes con GBM evaluados en nuestro trabajo, en 66 de ellos (39%) fue posible realizar una cirugía con aparente resección completa (RC) del tumor.

a) Descripción de la población

La tabla XXIII resume las principales características clínicas y relacionadas con los tratamientos utilizados en este subgrupo de pacientes.

Tabla XXIII. Características clínicas de pacientes con RC	
Sexo (%) Hombres / Mujeres	60 / 40
Edad media (años)	59
PS al diagnóstico (%) (0-1) / (2-3)	89 / 11
Tabaquismo (%) - No/Ex - Activo	59 41
Alcohol (%) - No/Ex - Activo	81 19
Debut clínico (%) - Déficit Neurológico - Cefalea - Crisis	70 36 18
Demora diagnóstica media (días) - Media (rango)	23 (0 - 299)
Localización (%) - Hemisféricos	100
Tamaño (cm) - Media (rango)	3,5 (0 - 7)
Demora cirugía (días) - Media (rango)	12 (1 - 80)
Morbilidad / Mortalidad posoperatoria (%)	21 / 2
Anticomieles (%)	85
RT externa (%) - Demora media (días)(rango)	88 52,7 (10 – 221)
Carmustina tópica (%)	27
QT sistémica (%) - Demora media (días)(rango) - Duración media (meses)	80 30 (11 – 111) 4,5

Tabla XXIII. Características de pacientes con RC (cont.)	
PS a la recaída (%) (0-1) / (2-4)	44 / 56
Cirugía de rescate (%)	22
QT de segunda línea (%)	46
QT de tercera y posteriores líneas (%)	9

En la tabla XXIV, se recogen las características moleculares de los tumores en estos mismos enfermos.

Tabla XXIV. Características moleculares de pacientes con RC	
p53 (%) (-/+) vs (++/+++)	66 vs 34
EGFR (%) (-) vs (+/++)	33 vs 67
p16 (%) (-/+) vs (++/+++)	72 vs 28
pRb (%) (-) vs (+/++)	35 vs 65
pTEN (%) (-) vs (+/++/C)	32 vs 68
Ki67 (%) (-) vs (+/++)	52 vs 48
CD31 (nº vasos) - Media (rango)	5,4 (0 - 19)
CD105 (nº vasos) - Media (rango)	11,6 (0 - 70)
MGMT (IHQ) (-) vs (+)	58 vs 42
MGMT Met30 (%) - No metilado vs Metilado	48 vs 52
MGMT Met50 (%) - No metilado vs Metilado	60 vs 40

En comparación con la serie global, en estos enfermos hay un PS 0-1 al debut en un 89% vs el 74% de todos los enfermos. También la demora diagnóstica es inferior, 23 vs 44 días. Los tumores son menos voluminosos, 3,5 vs 4,3 cm. Todos los GBM de esta cohorte tienen asiento hemisférico.

En cuanto a las maniobras terapéuticas, la demora desde el diagnóstico hasta la cirugía es inferior a la general, 23 vs 44 días. La morbilidad quirúrgica es similar. Sin embargo, y a pesar de practicarse resecciones en principio más extensas en este grupo, la mortalidad es más baja, 2 vs 10%. El empleo de anticomiciales es mayor que en el resto de la serie, 85 vs 72%.

Tanto la RT (88 vs 63%) como la QT tónica (26 vs 15%) y sistémica (80 vs 63%), se indicaron en más enfermos en este subgrupo. Las demoras de inicio de todas estas modalidades de tratamiento han sido similares a las de toda la población.

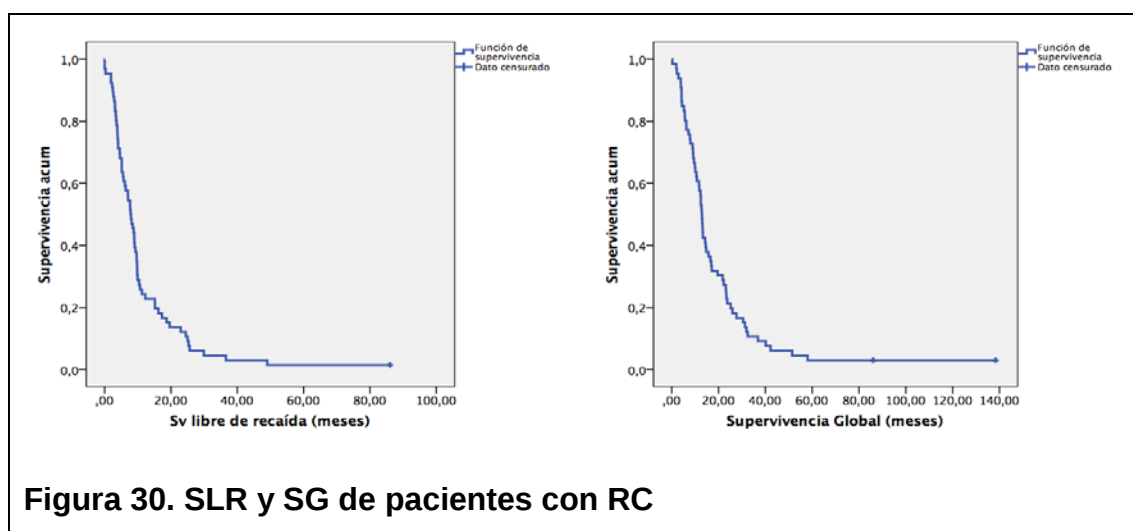
En el momento de la recaída, el PS se mantiene por encima de lo observado en la serie general, PS 0-1 (44 vs 26%). Tras producirse este evento, estos pacientes reciben más tratamientos activos (rescate quirúrgico 22 vs 8%; QT de 2ª línea 46 vs 27%; QT de 3ª y posteriores líneas 9 vs 5%).

Por último, las características moleculares observadas en este subgrupo no difieren de las de la serie general.

b) Análisis de supervivencia.

En el momento del análisis 65 y 64 de los enfermos de este subgrupo habían recaído y fallecido respectivamente.

La mediana de SLR es de 7,8 meses (IC95% 6,1 - 9,6) y la de SG de 12,9 meses (IC95% 11,9 – 13,8). Un 58, 32 y 21% de los enfermos en este grupo están vivos a los 12, 18 y 24 meses. (Figs. 30 y 31)



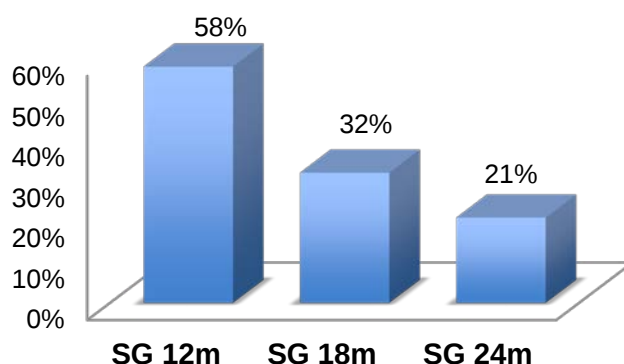


Figura 31. Supervivencia global de pacientes con RC

- Análisis univariante

Los resultados referentes a las variables que alcanzaron significación estadística están recogidos en la tabla XXV.

Tabla XXV. Analisis univariante en pacientes con RC

Variable (n)	Mediana SLR meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)
Edad (años)				
< 60 (31)	9,8 (8,5 – 11,5)	0,02	15,7 (5,7 – 25,8)	0,048
> 60 (35)	5,5 (2 – 9,1)		10,1 (5 – 15,1)	
< 70 (52)	8,9 (7,2 – 10,6)	< 0,0001	14,5 (10,5 – 18,5)	< 0,0001
> 70 (14)	3,1 (<1 – 5,5)		5,2 (1,8 – 8,7)	
PS				
0-1 (59)	8,4 (7 – 9,9)	0,03	13 (11,2 – 14,9)	0,03
2-3 (7)	5,2 (3,6 – 6,8)		9 (4,1 – 14,1)	
RT externa				
- No (8)	2,6 (<1 – 6,6)	< 0,0001	3,9 (3,4 – 4,3)	< 0,0001
- Sí (58)	8,7 (7,4 – 10,1)		13,2 (11,3 – 15,2)	
Demora RT (días)				
< 42 (23)	9,8 (7,5 – 12,1)	< 0,008	22,2 (5,3 – 39)	0,02
> 42 (35)	7,7 (4,7 – 10,6)		12,7 (11,1 – 14,4)	
QT sistémica				
- No (14)	2,3 (1,5 – 3,1)	< 0,0001	4,4 (2,5 – 6,2)	< 0,0001
- Sí (52)	12,4 (11 – 13,8)		14,5 (10,6 – 18,4)	
Demora QT (días)				
< 30 (28)	3,5 (2,2 – 4,7)	< 0,0001	22,2 (10,8 – 33,5)	0,001
> 30 (24)	9 (7,9 – 10,1)		10,1 (7,7 – 12,4)	

Tabla XXV. Análisis univariante en pacientes con RC (cont.)				
Variable (n)	Mediana SLR meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)
PS a la recaída 0-1 (28) 2-4 (36)	NA	NA	23,1 (21 – 25,2) 9,1 (6,6 – 11,6)	< 0,0001
IQ de rescate - No (51) - Sí (14)	NA	NA	11,8 (9,4 – 14,1) 22,2 (9,7 – 34,6)	< 0,0001
QT de 2ª línea - No (35) - Sí (30)	NA	NA	7,9 (4,6 – 11,3) 17,1 (7,3 – 26,9)	< 0,0001
p16 (-/+) (44) (++/+++) (17)	7,7 (5,9 – 9,4) 16,2 (6,2– 26,2)	0,001	12,7 (11,9 – 13,5) 23,4 (9,3 – 37,4)	< 0,015
CD31 < 5,4 vasos (33) > 5,4 vasos (19)	5,2 (2,3 – 8) 9,3 (8 – 10,5)	0,004	10,5 (6,4 – 10,7) 14,3 (12 – 16,5)	< 0,04
CD105 (endoglina) < 11,6 vasos (33) > 11,6 vasos (19)	5,5 (2,8 – 8,3) 9,3 (8,3 – 13,2)	0,01	10,5 (7,1 – 14) 14,7 (9,1 – 20,4)	< 0,04

NA: No aplicable.

En el ANEXO 3, adjunto al final de la Tesis, están recogidos los resultados en relación con el resto de las variables analizadas en este apartado.

- Análisis multivariante

Las tablas XXVI y XXVII, recogen los resultados obtenidos por el análisis multivariante. En ellas están se exponen las variables clínicas y moleculares escogidas por el modelo para la ecuación como asociadas significativamente con la SLR y SG.

Tabla XXVI. Análisis multivariante en pacientes con RC (SLR)			
Variable	HR	IC95%	p valor
QT sistémica - No vs Sí	0,1	0,1 - 0,3	< 0,0001
Demora a QT < o > 30 días	2,8	1,4 - 5,3	0,002
p16 (-/+) vs (++/+++)	0,3	0,1 - 0,6	0,001

Tabla XXVII. Análisis multivariante en pacientes con RC (SG)

Variable	HR	IC95%	p valor
QT sistémica - No vs Sí	0,1	0,1 - 0,3	< 0,0001
PS a la recaída (0-1) vs (2-4)	6,7	2,8 – 16	< 0,0001
QT de 2ª línea - No vs Sí	0,5	0,2 - 1	0,046
MET30 (RT-PCR) - No metilado vs Metilado	0,4	0,2 - 0,9	0,015

5.2 Pacientes con biopsia o resección tumoral parcial

De los 169 pacientes con GBM evaluados en nuestro trabajo, en 103 de ellos (61%) se realizó una biopsia, 68 casos, o una resección parcial del tumor, 35 casos.

a) Descripción de la población

La tabla XXVIII, resume las principales características clínicas y relacionadas con los tratamientos utilizados en este subgrupo de pacientes:

Tabla XXVIII. Características de pacientes con Bx o RP

Sexo (%) Hombres / Mujeres	53 / 47
Edad media (años)	62
PS al diagnóstico (%) (0-1) / (2-3)	64 / 36
Tabaquismo (%) - No/Ex - Activo	67 33
Alcohol (%) - No/Ex - Activo	77 23
Debut clínico (%) - Déficit Neurológico - Cefalea - Crisis	74 30 15
Demora diagnóstica media (días) - Media (rango)	48 (0 - 361)
Localización (%) - Hemisféricos - Diencefálicos / Multicéntricos	81 19

Tabla XXVIII. Características de pacientes con Bx o RP (cont.)	
Tamaño (cm) - Media (rango)	4,6 (2 - 8)
Demora cirugía (días) - Media (rango)	21 (0 - 150)
Anticomiciales (%)	63
Morbilidad / Mortalidad posoperatoria (%)	31 / 16
RT externa (%) - Demora media (días)(rango)	47 53 (4 – 200)
Carmustina tópica (%)	8
QT sistémica (%) - Demora media (días)(rango) - Duración media (meses)	53 34 (4 – 207) 3
PS a la progresión (%) (0-1) / (2-4)	15 / 85
Cirugía de rescate (%)	0
RT externa (reirradiación) (%)	1
QT de segunda línea (%)	14
QT de tercera y posteriores líneas (%)	2

En la tabla XXIX, se presentan las características moleculares de los tumores de este grupo de enfermos.

Tabla XXIX. Características moleculares de pacientes con Bx o RP	
p53 (%) (-/+) vs (++/+++)	67 vs 33
EGFR (%) (-) vs (+/++)	39 vs 61
p16 (%) (-/+) vs (++/+++)	69 vs 31
pRb (%) (-) vs (+/++)	29 vs 71
pTEN (%) (-) vs (+/++/C)	33 vs 67
Ki67 (%) (-) vs (+/++)	52 vs 48
CD31 (nº vasos) - Media (rango)	4,6 (0 - 20)
CD105 (nº vasos) - Media (rango)	10,3 (0 - 41)
MGMT (IHQ) (-) vs (+)	53 vs 47
MGMT Met30 (%) - No metilado vs Metilado	48 vs 52
MGMT Met50 (%) - No metilado vs Metilado	56 vs 44

En comparación con el global de la serie, este subgrupo exhibe un PS peor al diagnóstico, PS 0-1 (64 vs 74%). Aquí quedan encuadrados todos los tumores con localización diencefálica y multicéntricos. Las demás variables son similares a las descritas para el total de la población.

En relación a la cirugía, se observa un incremento de la mortalidad postoperatoria, 16 vs 10%. Además, menos enfermos reciben anticomiciales, 63 vs 72% en la serie global.

La indicación de RT y QT se ve disminuida en este grupo respecto a la serie general (RT; 47 vs 63% y QT; 53 vs 63%).

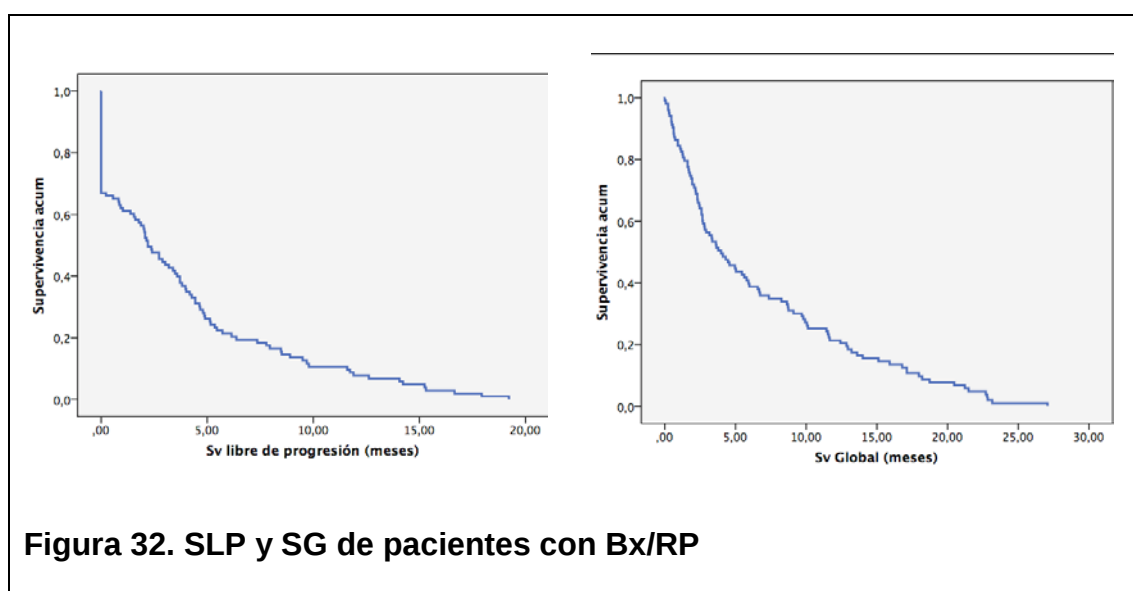
Tras la progresión, el estado general está más deteriorado, PS 0-1 (15 vs 26%). En ningún caso fue factible una cirugía de rescate y asimismo fue excepcional la indicación de QT de 2ª y sucesivas líneas, 14% y 2% respectivamente.

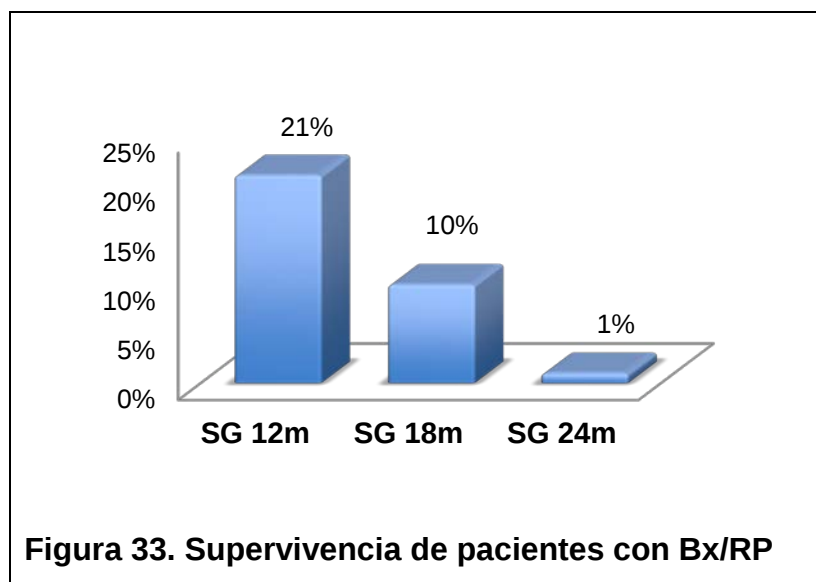
Igual que en los enfermos con resección completa, las características moleculares son superponibles a las descritas para el total de la serie.

b) Análisis de supervivencia.

En el momento del análisis todos los enfermos de este subgrupo (n=103) habían recaído y fallecido.

La mediana de SLP es de 2,2 meses (IC95% 1,4 - 3) y la de SG de 4 meses (IC95% 2,3 – 5,6). Un 21, 10 y 1% de los enfermos están vivos a los 12, 18 y 24 meses. (Figs. 32 y 33)





- Análisis univariante

La tabla XXX resume las variables que muestran una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia.

Tabla XXX. Análisis univariante en pacientes con Bx o RP				
Variable (n)	Mediana SLP meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)
PS				
0-1 (66)	3,4 (2 – 4,8)	0,009	5,5 (3 – 7,9)	0,001
2-3 (37)	< 1		2,6 (1,9 – 3,3)	
Clínica Debut			No significativo	
- Déficit (76)	1,9 (1,1 – 2,6)	0,02		
- Otros (27)	4 (1,5 – 6,5)			
Secuelas de IQ				
- No (70)	3,4 (2,4 – 4,4)	< 0,008	5,8 (3,5 – 8,1)	< 0,0001
- Sí (32)	< 1		2,1 (2,4 – 5,5)	
RT externa				
- No (55)	< 1	< 0,0001	1,9 (1,4 – 2,5)	< 0,0001
- Sí (48)	5,1 (4,4 – 5,9)		11,4 (9,4 – 13,4)	
Demora a RT (días)				
< 42 (19)	4,4 (3,5 – 5,4)	< 0,007	10,1 (8 – 12,1)	0,004
> 42 (29)	1,5 (< 1 – 2,7)		2,9 (2,1 – 3,8)	
QT sistémica				
- No (48)	< 1	< 0,0001	1,8 (< 1 – 2,7)	< 0,0001
- Sí (55)	4,4 (3,5 – 5,4)		9,1 (5,5 – 12,7)	
Demora a QT (días)				
< 30 (36)	4,3 (2,8 – 5,7)	< 0,0001	6,7 (2,1 – 11,4)	0,007
> 30 (19)	< 1		2,7 (2 – 3,3)	

Tabla XXX. Análisis univariante en pacientes con Bx o RP (cont.)				
Variable (n)	Mediana SLP meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)
PS a la progresión 0-1 (15) 2-4 (87)	NA	NA	12,8 (8,4 – 17,3) 3,1 (2,2 – 4,2)	0,01
QT de 2ª línea - No (35) - Sí (30)	NA	NA	2,9 (2 – 3,9) 15,1 (9,5 – 20,7)	0,001

NA: No aplicable.

Tras finalizar la Tesis, en el ANEXO 3, se adjuntan los resultados correspondientes al resto de las variables analizadas en este apartado.

- Análisis multivariante

Las tablas XXXI y XXXII, muestran los resultados obtenidos por el análisis multivariante. En ellas se exponen las variables clínicas y moleculares escogidas por el modelo para la ecuación como asociadas significativamente con la SLR y SG.

Tabla XXXI. Análisis mutivariante en Bx o RP (SLP)			
Variable	HR	IC95%	p valor
Demora diagnóstica < o > 90 días	0,2	0,1 - 0,5	0,001
RT externa - No vs Sí	0,1	0,1 - 0,2	< 0,0001
MGMT (IHQ) (-) vs (+)	1,9	1,1 - 3,4	0,03
CD31 < o > 4,6 vasos	0,5	0,3 - 0,9	0,03

Tabla XXXII. Análisis multivariante en Bx o RP (SG)

Variable	HR	IC95%	p valor
Secuelas postquirúrgicas - No vs Sí	3,5	1,7 - 7	< 0,0001
Anticomiciales - No vs Sí	0,4	0,2 - 0,7	0,002
RT externa - No vs Sí	0,2	0,1 - 0,6	0,002
QT sistémica - No vs Sí	0,3	0,1 - 0,9	0,02

6. Modelos probabilísticos. Redes bayesianas

A continuación se describen los modelos probabilísticos generados a partir de la serie global. Además, se exponen los resultados arrojados por las redes para asignar pacientes a grupos con los intervalos de SG definidos en el apartado de métodos (tabla VIII. Pag. 55).

6.1 Modelo o red total

El grafo representativo de este modelo está expuesto en la (Fig.34)

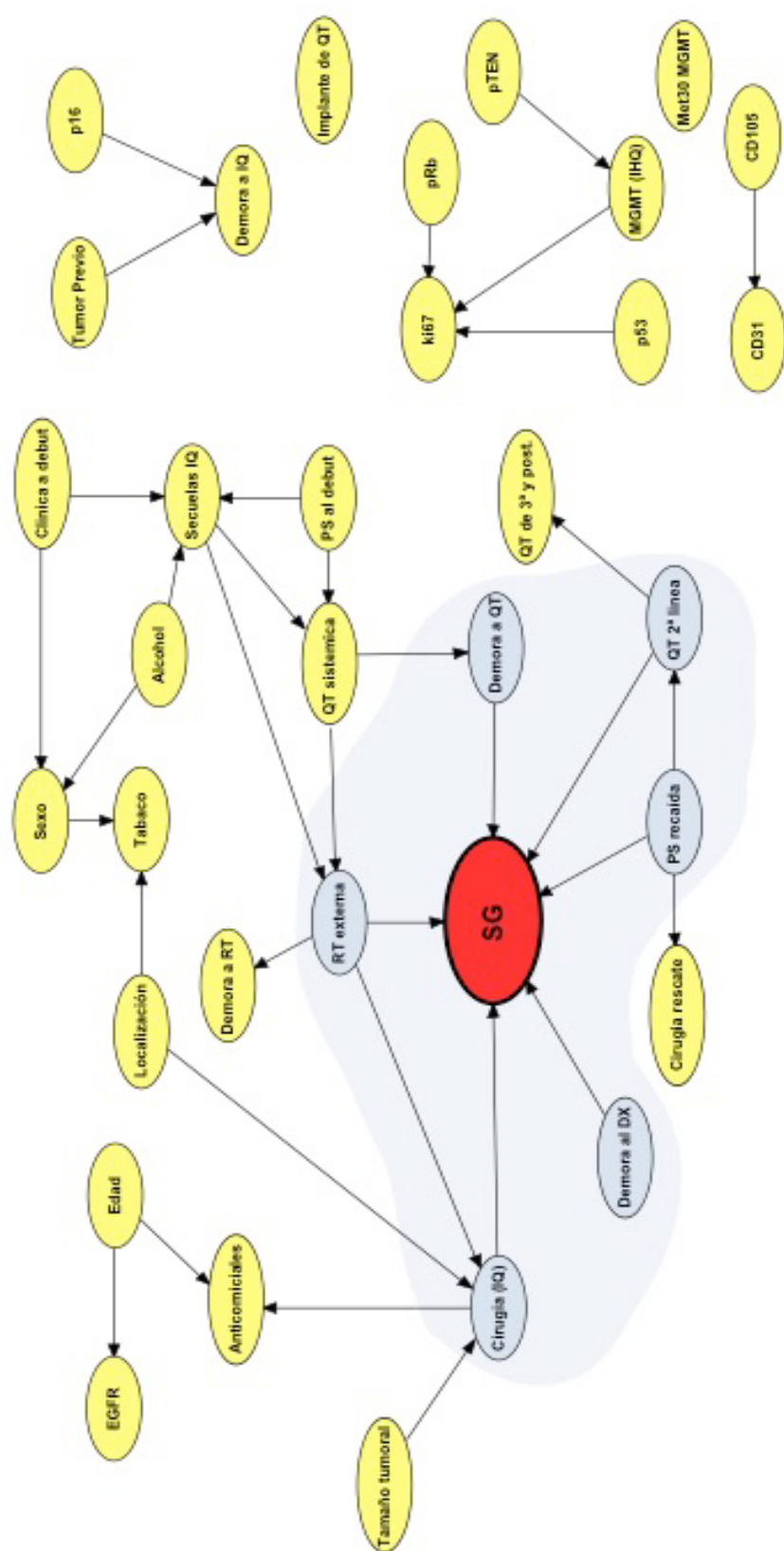
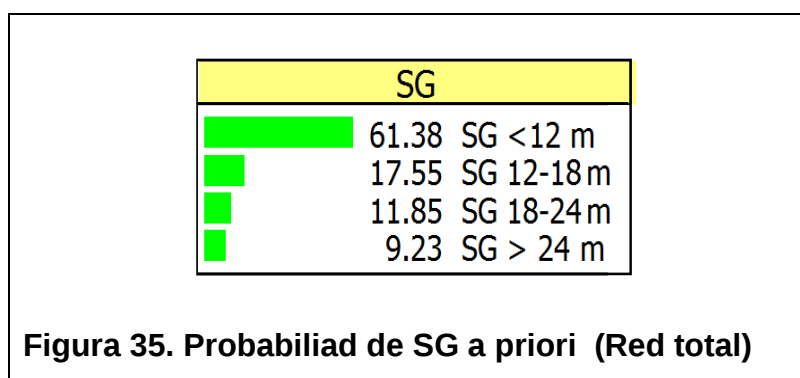


Figura 34. Red total

El área sombreada de la Fig. 34 corresponde con el *Markov blanket* para la variable SG. Está compuesto por cuatro variables de índole terapéutica (tipo de cirugía, RT externa, demora a inicio de QT y QT de 2ª línea) y otras dos de tipo clínico (demora al diagnóstico y PS a la recaída o progresión), siendo todas ellas padres del nodo objetivo (SG).

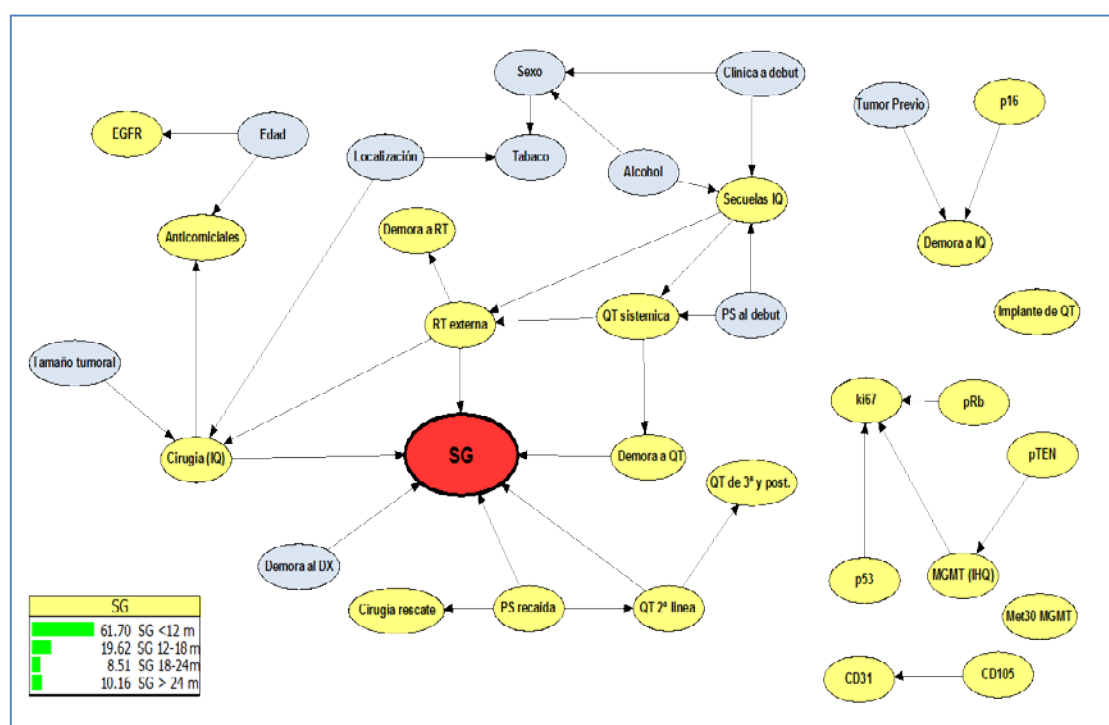
La probabilidad que estima el modelo a priori, sin conocerse el valor o estado de ninguna de las variables asociadas con la SG, para los diferentes estados o rangos de dicha supervivencia, está recogida en la (Fig. 35).



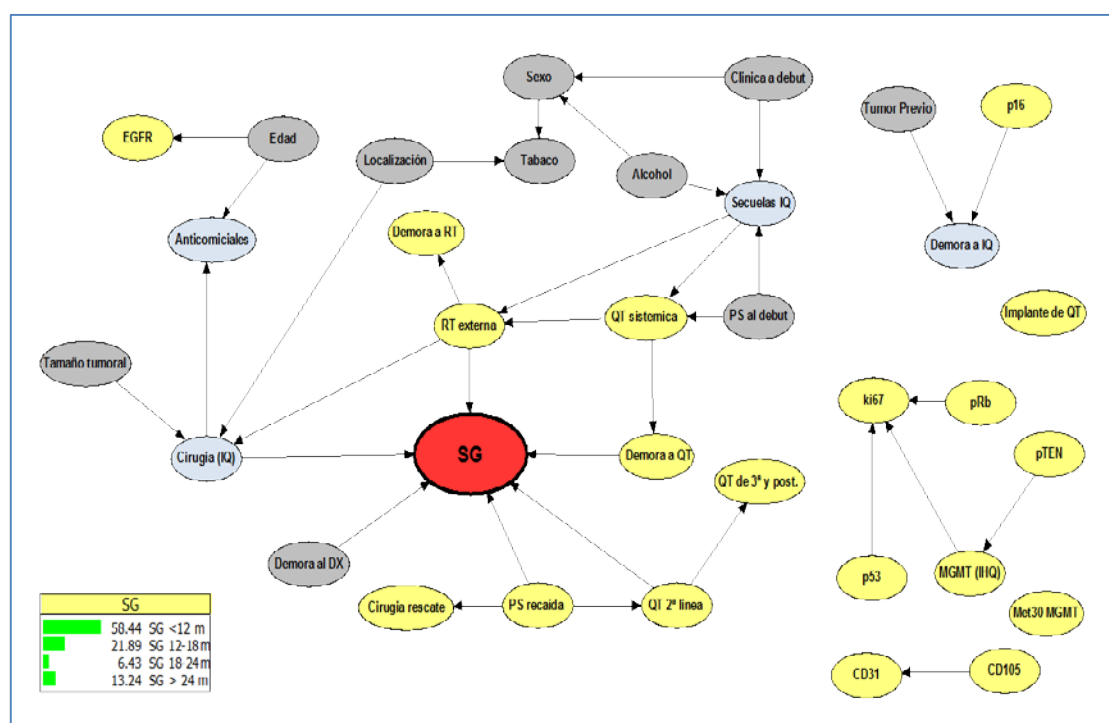
Sin embargo, a medida que se vayan aportando los valores disponibles en cada caso clínico para cada una de las variables relacionadas con el nodo objetivo, en el modelo se producirán cambios a nivel de los demás nodos asociados y, por supuesto, de la probabilidad para cada una de las categorías de dicho nodo objetivo, la SG. Por definición, una vez disponible toda la evidencia para los nodos que componen el *Markov blanket*, el aporte de información referente a las demás variables no afectará esta probabilidad.

Experimento 1: Caso clínico

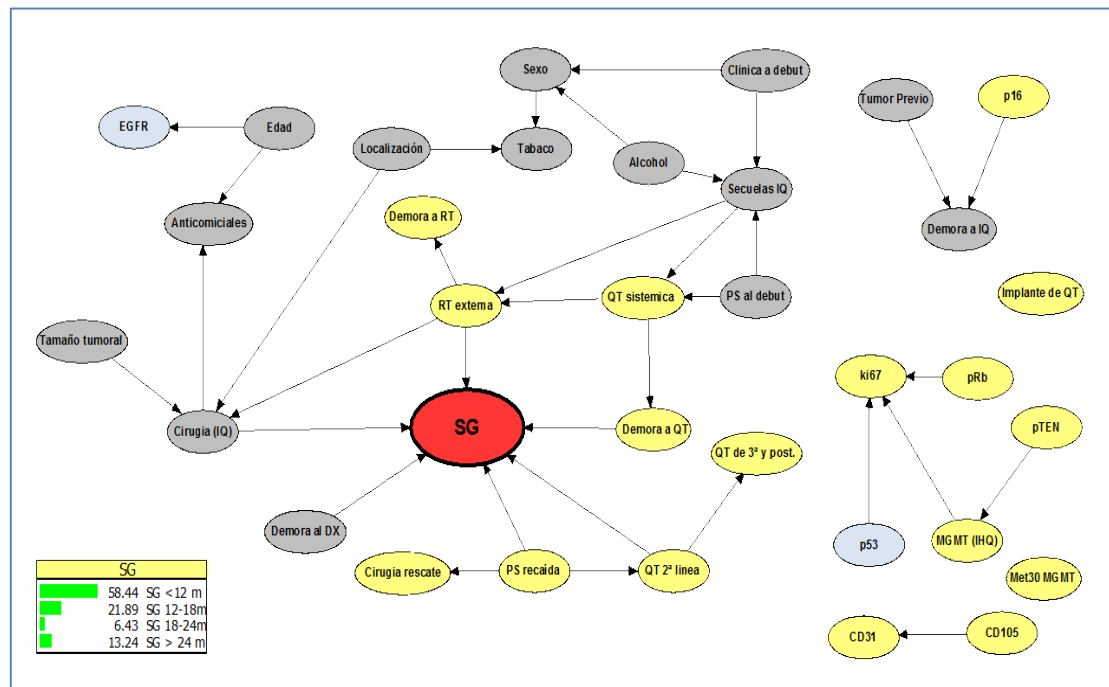
Paciente varón de 62 años, sin antecedentes de interés, ni hábitos tóxicos. Diagnosticado mediante RMN de un GBM parietal derecho, de 3 cm de diámetro, a raíz una cefalea de 2 meses de evolución rebelde al tratamiento con antiinflamatorios. No hay otros síntomas asociados.



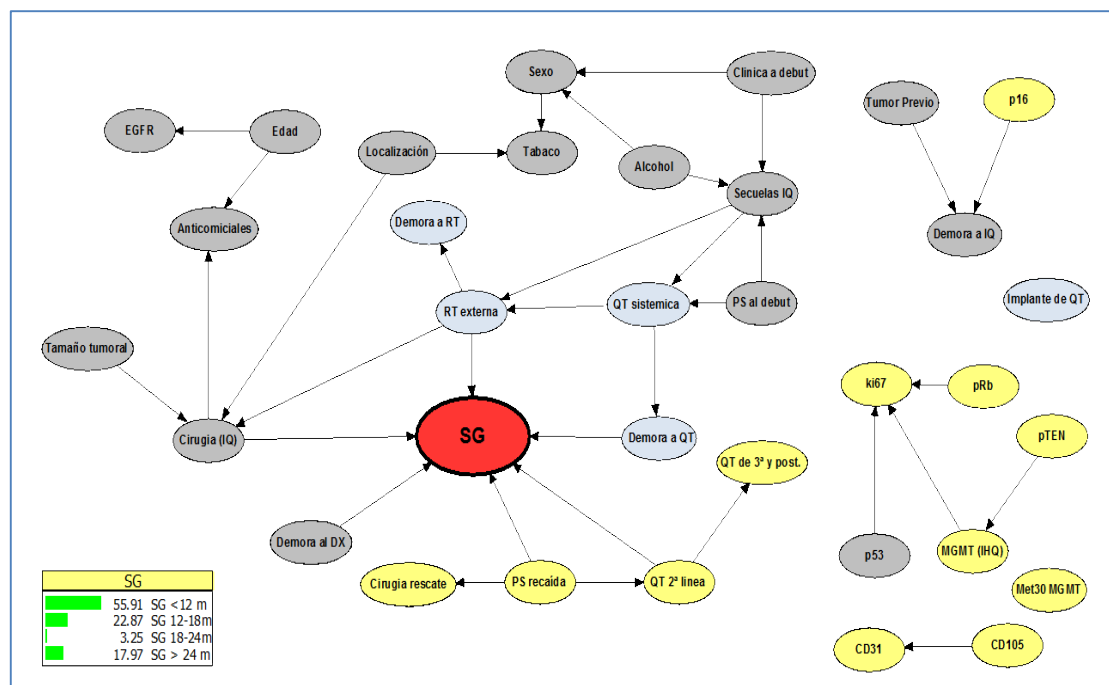
Finalmente, a las 2 semanas del diagnóstico, se lleva a cabo la cirugía alcanzando aparentemente una resección tumoral completa, sin presentar el paciente secuelas durante el postoperatorio. Se pauta tratamiento anticomicial.



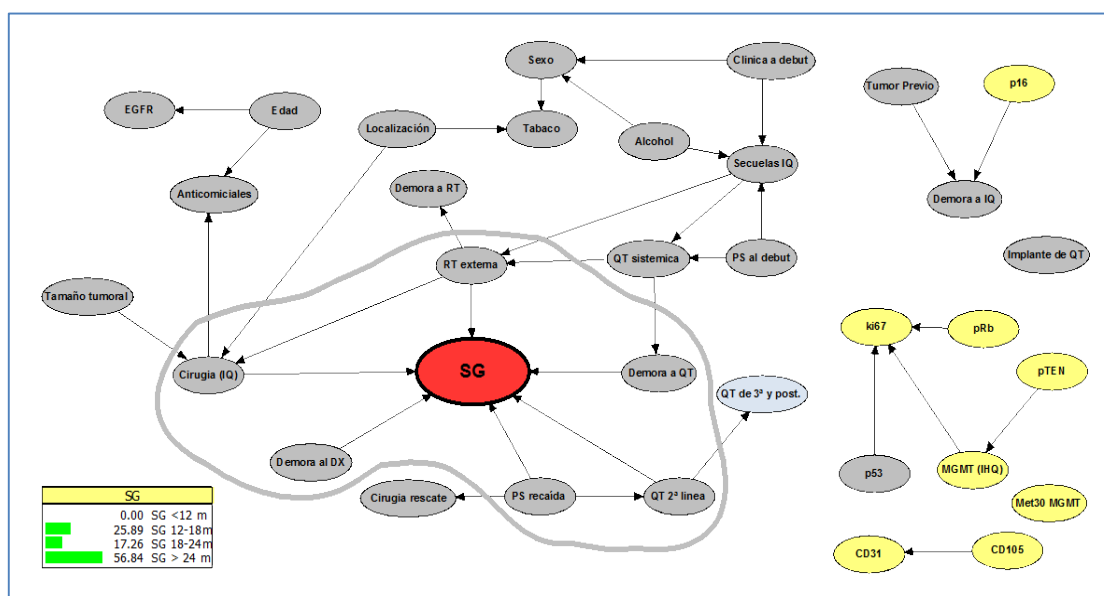
El informe de anatomía patológica es de GBM con p53 (-) y EGFR (+).



Se decide entonces iniciar QT/RT según el esquema de Stupp con temozolomida. El tratamiento comienza 4 semanas después de la intervención.



Se completa dicha terapia según lo previsto y el paciente sigue posteriormente revisiones periódicas. Todo va bien hasta que, aproximadamente a los 14 meses de la cirugía, presenta una crisis comicial tras la que persiste una monoparesia (4/5) del brazo izquierdo como único síntoma residual. En ese momento, se realiza una RMN craneal que describe una extensa recaída tumoral.



Tras 4 meses de tratamiento, el paciente presenta un deterioro neurológico evidente con encamamiento progresivo por lo que se suspende la terapia activa, pasando entonces a recibir exclusivamente un manejo sintomático. Fallece 1 mes más tarde. La SG finalmente fue de aproximadamente 26 meses.

Experimento 2: Casos prueba

El análisis de los 17 “casos prueba”, previamente apartados de la serie global durante la generación y entrenamiento de la red obtiene los siguientes resultados:

Tabla XXXIII. Tabla de contingencia (Experimento 2). Red total				
Realidad \ Predicción	SG < 12 m	SG 12 – 18 m	SG 18 – 24 m	SG > 24 m
SG < 12 m	9	0	0	0
SG 12 – 18 m	2	0	0	0
SG 18 – 24 m	0	0	0	0
SG > 24 m	0	1	1	1

En 3 de los casos, el modelo carece de información o evidencia suficiente para realizar una predicción, por ello estos datos corresponden a los 14 enfermos restantes.

La precisión o tasa de acierto del modelo en estos casos es del 72%.

Experimento 3: Series virtuales

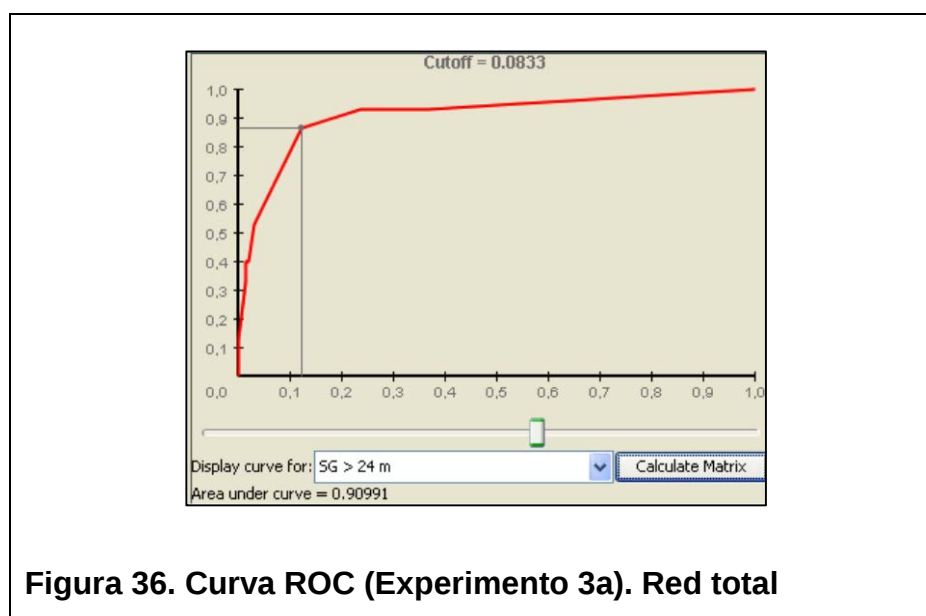
a) Serie virtual global

En el caso de los casos generados de forma aleatoria por el software ($n = 200$). Los resultados del análisis son:

Tabla XXXIV. Tabla de contingencia (Experimento 3a). Red total				
Realidad Predicción	SG < 12 m	SG 12 – 18 m	SG 18 – 24 m	SG > 24 m
SG < 12 m	114	22	6	3
SG 12 – 18 m	3	7	4	2
SG 18 – 24 m	4	4	13	0
SG > 24 m	2	4	2	10

La precisión o tasa de acierto en esta serie es, de nuevo, del 72%.

En relación con la pericia para detectar con esta red a los largos supervivientes en la serie global, los resultados de la curva ROC están representados en la (Fig. 36)



La precisión o exactitud en este caso alcanza el 78% y la pericia (AUC de curva ROC) es de 0,91.

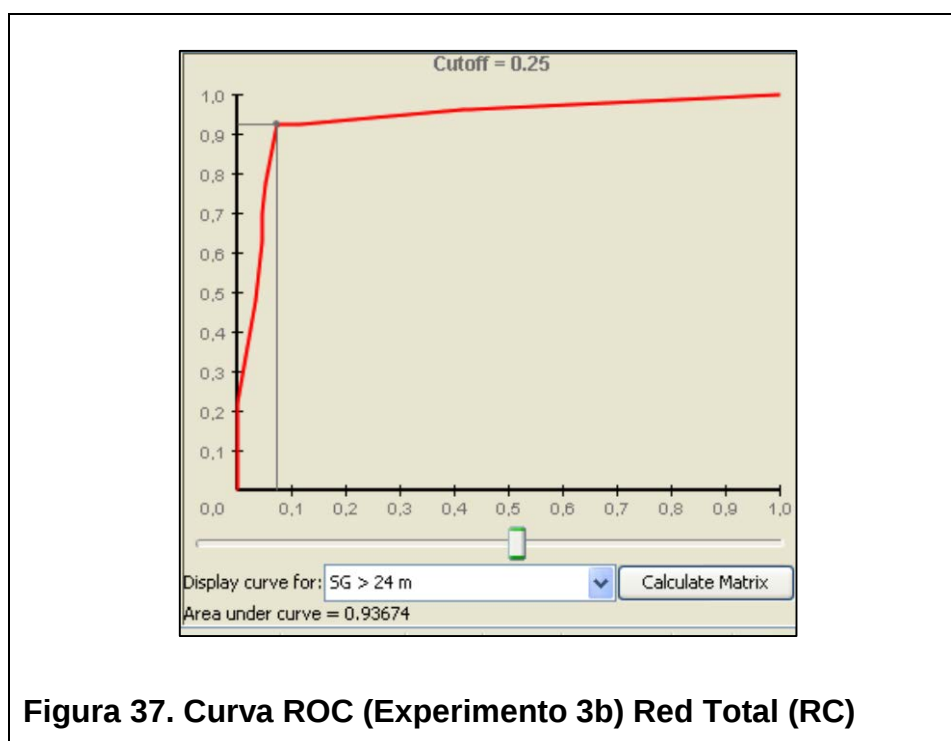
b) Serie virtual con resección completa (RC)

La tabla XXXV recoge los resultados del modelo aplicado de forma específica en la subpoblación de enfermos con resección completa (RC).

Tabla XXXV. Tabla de contingencia (Experimento 3b). Red total (RC)				
Realidad Predicción	SG < 12 m	SG 12 – 18 m	SG 18 – 24 m	SG > 24 m
SG < 12 m	106	32	1	1
SG 12 – 18 m	2	7	1	0
SG 18 – 24 m	0	0	9	0
SG > 24 m	1	10	4	26

La precisión o tasa de acierto en esta serie es del 74%.

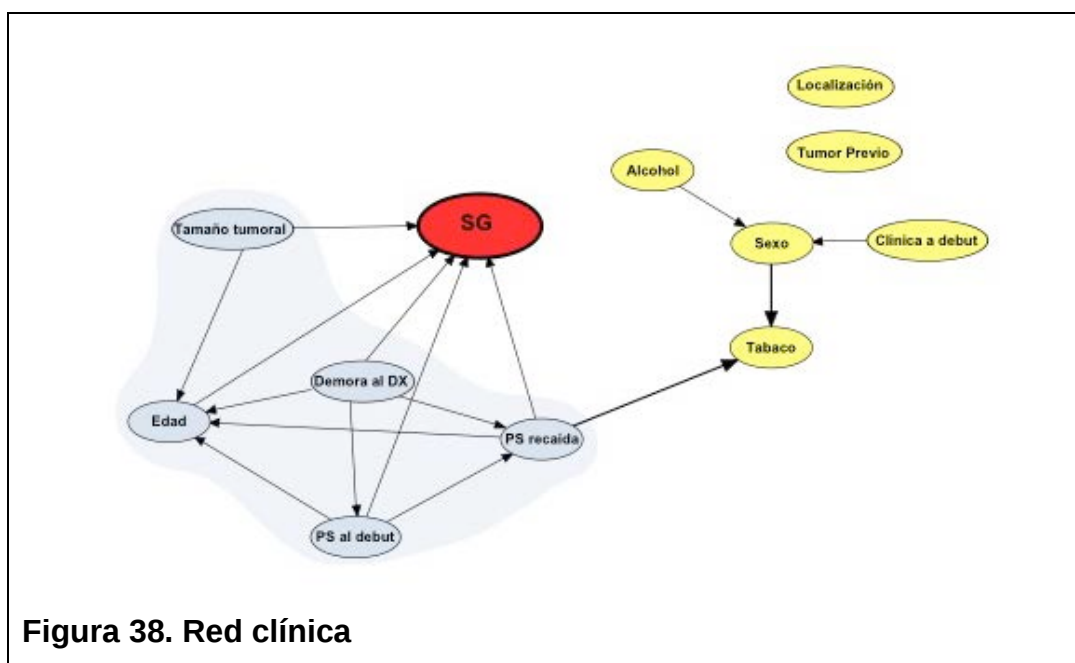
Esta vez, la curva ROC (Fig. 37) y los resultados de eficacia para detectar con esta red a los “largos supervivientes” son:



La tasa de acierto en este contexto de enfermos con RC alcanza el 89% y la pericia es de 0,94.

6.2 Modelo o red clínica

El grafo correspondiente a este modelo está representado en la (Fig.38)



El *Markov blanket* de este modelo está conformado por cuatro variables de las que habitualmente se dispone desde el debut del caso (edad, PS al debut, tamaño y demora diagnóstica) y otro nodo que corresponde con una característica que aparece a lo largo de la evolución del paciente (el PS a la recaída o progresión).

La probabilidad a priori estimada por la red para los diferentes estados o rangos de SG está recogida en la siguiente tabla.

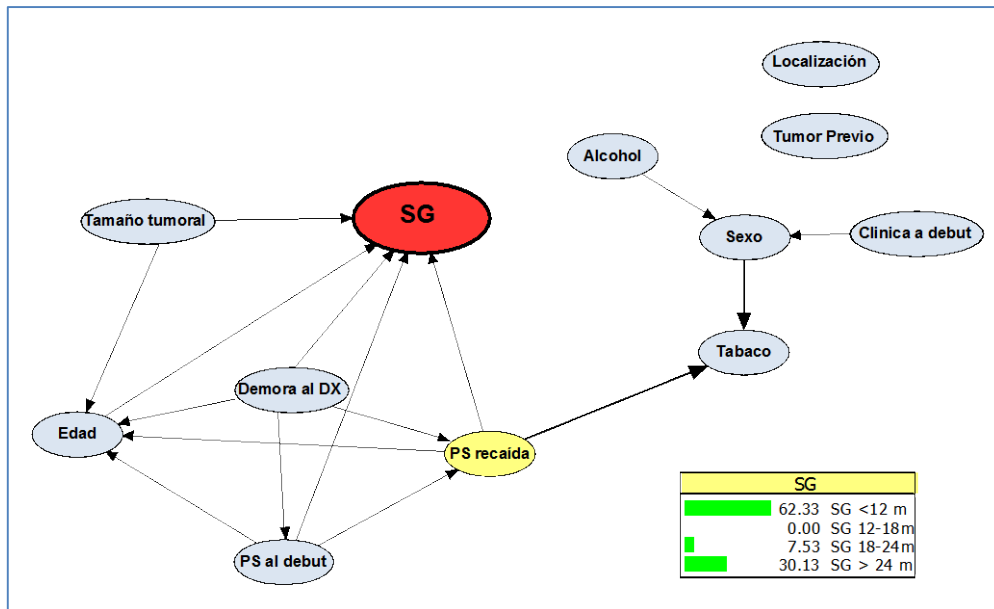
SG		
	62.93	SG <12 m
	17.58	SG 12-18m
	10.29	SG 18-24 m
	9.19	SG > 24 m

Figura 39. Probabilidad de SG a priori (Red clínica)

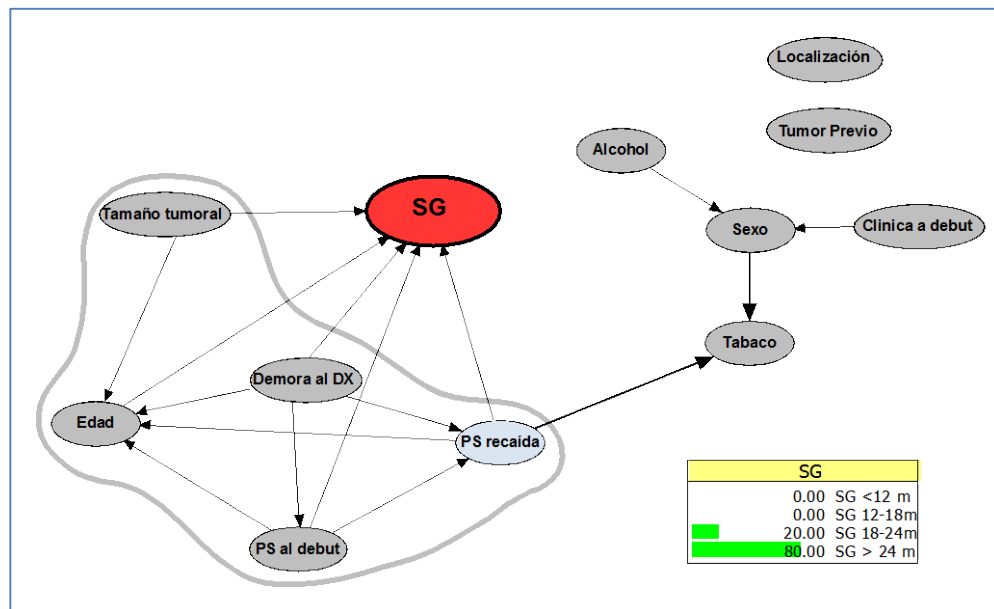
Experimento 4: Caso clínico

Volviendo al caso concreto de nuestro paciente, con este modelo el comportamiento y la evolución de las probabilidades para la SG serían las siguientes:

- Tras la consulta inicial:



- Y tras la recaída:



Experimento 5: Casos prueba

Tras analizar con esta red los 17 “casos de prueba”, los parámetros de eficacia o utilidad de esta red son los siguientes (tabla XXXVI).

Tabla XXXVI. Tabla de contingencia (Experimento 5). Red clínica				
Realidad Predicción	SG < 12 m	SG 12 – 18 m	SG 18 – 24 m	SG > 24 m
SG < 12 m	8	0	0	0
SG 12 – 18 m	1	0	0	0
SG 18 – 24 m	1	0	1	0
SG > 24 m	0	1	0	1

Con este modelo son 4 los enfermos en los que no se dispone de suficiente evidencia para clasificar el caso.

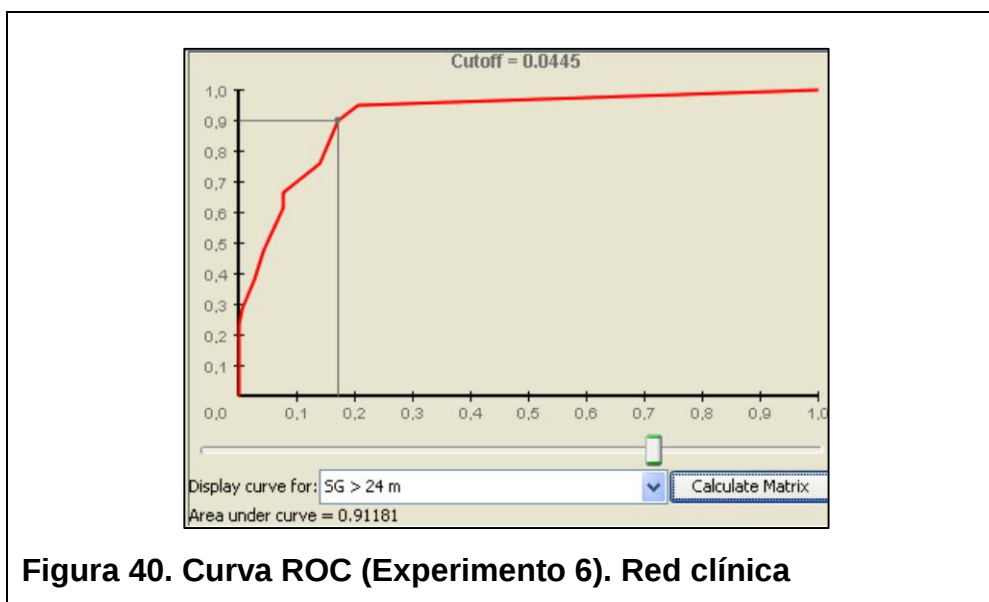
La evaluación de los 13 restantes arroja una exactitud del 77%.

Experimento 6: Serie virtual

Los datos referentes al análisis de la población virtual global (n = 200), se muestran a continuación (tabla XXXVII).

Tabla XXXVII. Tabla de contingencia (Experimento 6). Red clínica				
Realidad Predicción	SG < 12 m	SG 12 – 18 m	SG 18 – 24 m	SG > 24 m
SG < 12 m	129	11	1	5
SG 12 – 18 m	4	14	4	3
SG 18 – 24 m	1	2	8	6
SG > 24 m	1	2	2	7

La exactitud es similar a la previa, del 79% en esta ocasión.



La precisión o exactitud en este caso alcanza el 82%. La pericia (AUC de curva ROC) para detectar a los largos supervivientes es de 0,91 (Fig 40).

Experimento 7: Datos clínicos de “primera consulta”

Por último, se analizan los resultados obtenidos con este mismo modelo mediante el aporte exclusivo de las 4 variables en la población de entrenamiento (n=152). Estas características, componentes todas ellas del *Markov blanket* para la SG, habitualmente son conocidas desde la primera consulta.

Tabla XXXVIII. Tabla de contingencia (Experimento 7). Red clínica				
Realidad Predicción	SG < 12 m	SG 12 – 18 m	SG 18 – 24 m	SG > 24 m
SG < 12 m	93	20	10	12
SG 12 – 18 m	2	8	2	2
SG 18 – 24 m	0	0	3	0
SG > 24 m	0	0	0	0

En este caso la precisión baja al 69%.

Para la detección de largos supervivientes, la tasa de acierto es del 65% y la pericia de 0,88 (Fig. 41).

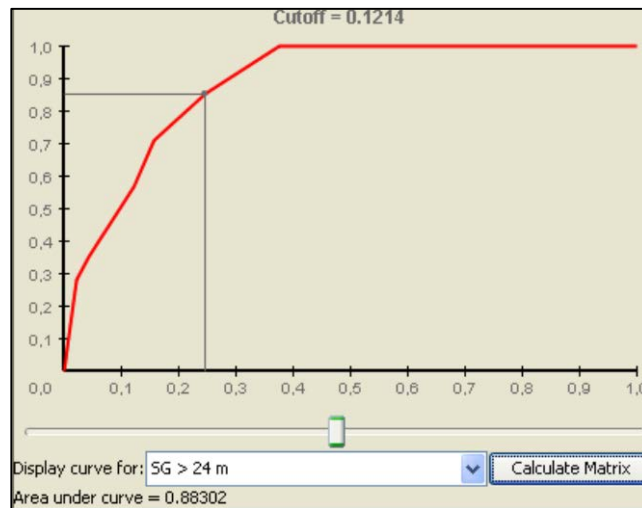
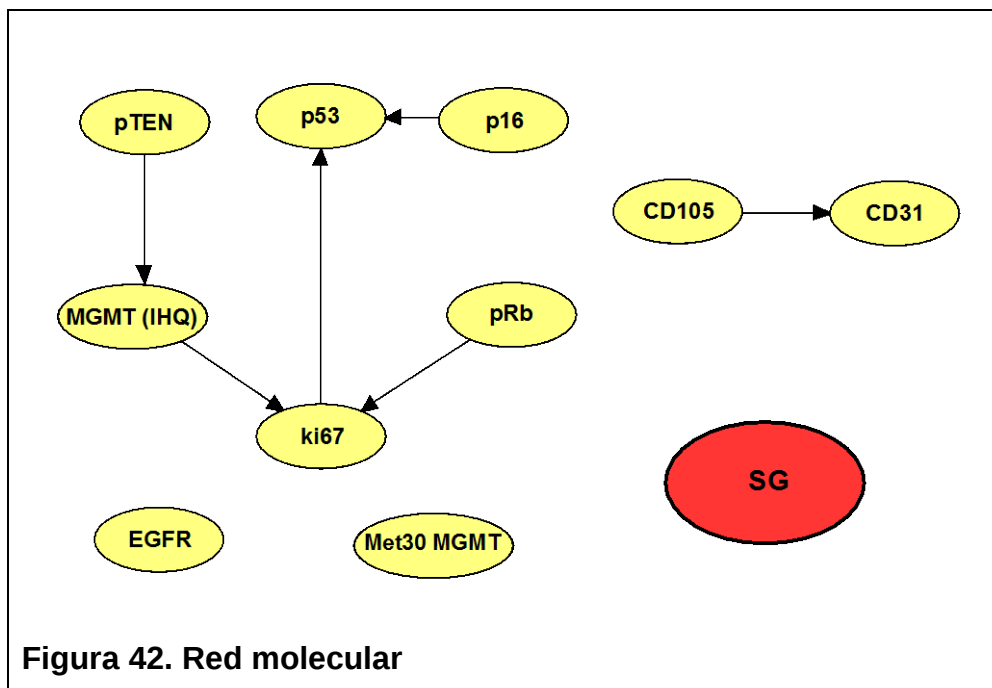


Figura 41. Curva ROC (Experimento 7) Red clínica

6.3 Red molecular

Según estos modelos, no hay asociación de ninguna variable molecular, con la SG. (Fig. 42)



V. Discusión y comentarios

V. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Se exponen a continuación las principales reflexiones realizadas tras llevar a cabo una evaluación detallada de los resultados obtenidos por el análisis de los datos clínicos y variables moleculares de los pacientes con GBM incluidos en nuestra serie, así como de sus potenciales implicaciones y aplicaciones prácticas.

1. Objetivo primero: Describir la población de pacientes con GBM tratados en el H.U. Marqués de Valdecilla (2000-2010)

1.1 Características clínicas

Nuestra serie se ajusta, en cuanto a las principales características epidemiológicas se refiere (distribución por sexos, edad media de presentación, localización, tamaño tumoral y PS al debut), a las principales series publicadas en la literatura científica internacional en este contexto.²⁰

Así en la serie aparece un ligero predominio del sexo masculino para este tipo de tumores. Aproximadamente 3/4 de los enfermos presentan una situación clínica buena al diagnóstico (PS 0-1) a pesar de los síntomas. La distribución o localización tumoral dentro del SNC es muy homogénea, principalmente son los lóbulos de mayor tamaño los más frecuentemente afectados (frontales, parietales y temporales). Esa circunstancia explica perfectamente el patrón clínico de debut. A destacar el hecho de que ningún enfermo debuta como hallazgo casual, es decir sin síntomas. Esto se debe sin duda a que las exploraciones dirigidas a descartar alteraciones en el SNC, TAC o RMN, no se realizan habitualmente como técnicas de cribado en individuos asintomáticos.

La principal diferencia encontrada en este sentido es el hecho de que el síntoma guía más frecuente en nuestros enfermos es el déficit neurológico, presente hasta en un 71% de las ocasiones al debut, mientras que en esas mismas publicaciones este lugar lo ocupa la cefalea, referida como primer síntoma por el 53-57% de los pacientes. Este hecho pudiese ser explicado porque al haberse recogido la información de nuestros enfermos de forma retrospectiva a partir de los datos anotados en la historia clínica, el déficit neurológico es considerado probablemente por el profesional médico como una alteración más relevante, específica y objetiva que la cefalea. Esto estaría entonces derivado de un registro en la historia clínica deficitario, que en ocasiones puede no reflejar de forma exacta los síntomas referidos o considerados por el paciente. De hecho, este síntoma, muchas veces será evidenciado a posteriori como presente en los meses previos, sin haber sido considerado de especial relevancia hasta no haberse asociado otras alteraciones. Así, es posible que la cefalea esté infravalorada en nuestra serie (34 vs 57%) y, en contraposición, el déficit neurológico tenga una mayor presencia. Además, otra potencial explicación para estas variaciones podría fundamentarse en el hecho de que en las experiencias publicadas se refieren de forma independiente síntomas

como las alteraciones conductuales, motoras, sensoriales o de la memoria. Es posible, sin embargo, que la suma de todas ellas supere a los casos con cefalea como síntoma de debut. En nuestra serie todos estos síntomas han sido incluidos de una manera más simplista bajo el apóstrofe de déficit neurológico, sin haberse hecho por tanto esta distinción.

Por otra parte, si comparamos nuestra población con los enfermos incluidos en los ensayos clínicos de registro para este mismo contexto clínico se observa como, siendo los principales ítems también superponibles a los descritos en nuestros pacientes, esta última población presenta un mejor estado general (PS 0-1 en 87 vs 74%), obviamente asociado con el hecho de tratarse de enfermos seleccionados para protocolos de investigación.⁵⁷

1.2 Tratamientos empleados

Comenzando por el tipo de cirugía practicada en estos pacientes, la distribución de las diferentes modalidades (biopsia, resección parcial o total) no difiere sustancialmente de forma global en comparación con la referida en las series ya mencionadas.²⁰

Una vez más, existen algunas divergencias entre nuestros datos y los descritos en los ensayos clínicos en cuanto a la proporción de biopsias y resecciones parciales practicadas (40/21% vs 17/44%), manteniéndose eso sí las tasas de resección completa (39 - 40%) y siendo esta última cifra inferior a la de series clínicas más actuales.^{56,128} De nuevo estos valores son derivados probablemente de una mayor selección de los pacientes.

La tasa de complicaciones postoperatorias de nuestro centro duplica la recogida en series de casos recientemente publicadas en nuestro entorno (28 vs 14%) manteniéndose sin embargo la mortalidad postquirúrgica en similares rangos (10 vs 8%).¹²⁹ Este incremento en la morbilidad de la cirugía está asociado probablemente a la alta tasa de complicaciones desarrolladas fundamentalmente en los pacientes sometidos a biopsia en los primeros años de nuestra serie, cuando este procedimiento aún no se realizaba con guía de estereotaxia de forma rutinaria. Esta asociación ya se ha descrito también en algunas otras series clínicas sugiriéndose la biopsia como un factor predictivo independiente de morbilidad postoperatoria.¹²⁸ El tiempo de demora entre el diagnóstico radiológico y la cirugía es inferior a un mes en la mayoría de los casos en todas estas series, incluida la nuestra.

Todos los enfermos de nuestro centro han recibido corticoides como terapia de soporte durante su evolución postoperatoria, este hecho se repite en los datos aportados por la literatura. El uso de anticonvulsivantes en nuestro contexto (72%), está en la línea de lo reportado previamente por otros autores.²⁰

Los resultados referentes a los tratamientos utilizados tras la cirugía en estos enfermos, QT y RT, son también similares en cuanto a los compuestos y dosificaciones empleadas.

No obstante deben realizarse ciertas matizaciones dentro de este punto. En la serie internacional publicada utilizada como referencia en este trabajo, se describen el uso de RT y QT con TMZ en un 87 y 54% de los casos respectivamente.²⁰ Según nuestros datos, estas mismas maniobras han sido pautadas en ambos casos en un 63% de los enfermos. La indicación de implantes o tabletas de carmustina en el lecho quirúrgico se realizó en torno al 15% en ambas series. Los casos recogidos en esta publicación corresponden a pacientes tratados entre los años 1997 y 2000. La QT concomitante con irradiación local, ya utilizada previamente, comenzó a estudiarse en este contexto clínico a finales de la década de los 90, consolidándose esta asociación definitivamente como un estándar de tratamiento aproximadamente una década más tarde.⁵¹ Por último, la incorporación de la TMZ a esta combinación según el régimen vigente a día de hoy está basada principalmente en los resultados de eficacia obtenidos posteriormente por el grupo de Stupp.^{56,57} Así visto, es posible que las diferencias temporales existentes entre las fechas de diagnóstico y tratamiento de los enfermos de las dos series justifiquen estas variaciones, por corresponderse en cada caso los esquemas de tratamiento empleados con un estándar más o menos consolidado para cada época. De hecho en una publicación más reciente que recoge datos de pacientes tratados entre 2008-2010 en España, previamente referenciada, un 57% de los enfermos recibieron QT/RT postoperatoria con TMZ, siendo esta cifra más cercana a la observada en nuestra experiencia. Esta misma serie, reproduce asimismo de forma muy similar la mayoría de las variables clínicas hasta ahora comentadas en este apartado.¹²⁹

Es destacable el dato que refleja un aparente mayor esfuerzo terapéutico invertido en el subgrupo de pacientes en los que la cirugía fue radical o completa en comparación con aquellos en los que se realizó una cirugía subóptima. Los primeros recibieron QT/RT postquirúrgica hasta en un 86% de los casos mientras que estas mismas maniobras únicamente fueron empleadas en un 47% de los enfermos biopsiados o con resección parcial. Esta circunstancia podría estar justificada por el hecho de que en enfermos con estado general subóptimo al diagnóstico, habitualmente no se indican cirugías agresivas y muchas veces el intento quirúrgico se limita a obtener una simple biopsia confirmatoria de la sospecha clínica o únicamente una descompresión paliativa. Los resultados de los test de correlación para estas dos variables confirman una asociación significativa entre ambas apoyando así esta hipótesis.

La toxicidad clínicamente relevante, g.2 / 3 o superior NCI-CTC¹⁰⁷, de la QT en nuestra serie, principalmente la trombopenia, es ligeramente inferior a la referida por los investigadores del estudio de registro (8 vs 12%).⁵⁶ Esto es posiblemente debido a una recogida habitualmente más laxa de este tipo de datos durante la

práctica real de la consulta diaria en comparación con la realización de esta misma tarea en los pacientes de ensayo clínico.

Por último en este apartado, relacionado con los tratamientos de primera línea, es destacable el dato de la demora media observada en nuestro centro entre la cirugía y el inicio de RT, situada en casi 53 días. Este hecho, no es tan llamativo en el caso de la QT con TMZ, con casi 34 días. Este valor es claramente superior al recomendado por algunos grupos como la RTOG, que tras haber analizado los resultados de 16 estudios aleatorizados sugieren un impacto significativo en términos de SLP y SG derivado de una espera superior a 42 días.^{130,131,132} Este aspecto será analizado y discutido con mayor detalle más adelante en el apartado dedicado a comentar de forma específica los datos del análisis de supervivencia de nuestra serie.

En cuanto a las terapias de segunda línea, el número de enfermos que recibe únicamente un manejo sintomático en ese contexto es similar a lo referido por otros autores con experiencias más recientes (60-65%).^{128,129} Como consecuencia de esto, en general, solamente un 35-40% de los casos son tratados de forma activa tras la recaída o progresión tumoral. Esto está sin duda en relación con el deterioro franco que presentan la mayor parte de los enfermos en esta circunstancia. Así, según nuestros datos únicamente un 26% de los casos conservan un PS 0-1 en ese momento, añadiéndose un 30% más si se incluyen los pacientes con PS 2, y por tanto podrían ser potenciales candidatos para recibir una terapia activa en segunda línea. Cuando se decide continuar con la terapia antitumoral, dentro de las opciones de tratamiento sistémico el fármaco antiangiogénico bevacizumab, asociado o no con CPT-11, se sitúa como la alternativa más empleada en estos enfermos, siendo otras modalidades como el rescate quirúrgico o la radiocirugía opciones anecdóticas reservadas para unos pocos casos muy seleccionados.

1.3 Características moleculares

Para comenzar este apartado nos gustaría resaltar el hecho de que, a pesar de haber llevado a cabo todos los procedimientos de manipulación de muestras, fabricación de los TMA y realización de las técnicas de tinción IHQ o RT-PCR, con el mayor de los cuidados y mediante protocolos estandarizados, existe una tasa de pérdidas de entre el 3 y el 15% de los resultados, dependiendo de la determinación considerada. Esta cifra se ajusta a lo que generalmente se reporta en gran parte de las experiencias clínicas relacionadas con la manipulación de muestras biológicas por lo que, aunque no deseable, puede considerarse como asumible.

En relación a los resultados obtenidos con estas determinaciones destacamos los siguientes aspectos:

- **p53.** Esta proteína, reguladora de la apoptosis celular, está codificada por el gen TP53 situado en el brazo largo del cromosoma 22 (22q). Las mutaciones a este

nivel están descritas hasta en un tercio de los GBM primarios y son más frecuentes, hasta dos tercios, en los casos de GBM secundarios.⁸ En nuestro trabajo se ha determinado por IHQ la proteína resultante de la expresión de este gen (p53).

Los enfermos de nuestra serie presentan ausencia de expresión de la proteína p53 en un 45% de los casos, siendo además esta expresión inferior al 5% en otro 22% de las muestras. En total se podría considerar al 67% de los enfermos como “negativos” para p53. Teniendo en cuenta que la mayoría de los GBM incluidos son, en principio, primarios (> 95%) estos valores podrían llamar la atención y ser discordantes con lo anteriormente referido y publicado.

Sin embargo, para ponderar adecuadamente estos resultados conviene antes tener en cuenta a otros participantes en el sistema de regulación de la expresión del gen TP53, fundamentalmente a las proteínas MDM2 y p14^{ARF}. Estas moléculas pueden presentar amplificación, en el caso de la primera, o disminución de sus niveles de expresión por metilación de su promotor, en p14^{ARF}, hasta en un 10% y un 6-30% de los casos de GBM respectivamente.^{9,133} Así, en caso de estar presentes estas disregulaciones en la vía, podrían dar lugar como consecuencia final a una mayor inhibición de la expresión del gen TP53 y con ello una mayor número de GBM p53 (-). Estas proteínas no han estudiadas en nuestro trabajo, justificándose quizás así al menos en parte nuestras observaciones. De hecho, publicaciones recientes en las que se determina por IHQ con diferentes punto de corte esta proteína, reportan frecuencias de GBM p53 (-) más cercanas a las nuestras, y en todo caso superiores al 50% de los casos.¹³³

- **EGFR.** El aumento de los niveles de este producto de la familia de los (RTK), como resultado de la sobreexpresión de un gen situado en el brazo corto del cromosoma 7 (Cr7p), constituye una de las alteraciones moleculares más frecuentemente descritas en los GBM, fundamentalmente primarios.⁸

La amplificación del gen EGFR, está presente en un 36% de los GBM. Esta alteración parece ser mutuamente excluyente con la existencia de mutaciones a nivel de TP53. Existen además mecanismos alternativos que, en menor frecuencia, dan también lugar a una sobreexpresión de la proteína EGFR en alrededor del 60% de los GBM según algunos autores.⁸ Este valor se reproduce de forma fidedigna en los resultados de nuestros enfermos.

- **pTEN, p16 y pRb.** No hay apenas variaciones significativas entre los resultados obtenidos en nuestra experiencia y los datos publicados hasta la fecha en relación con la presencia o no de este tipo de alteraciones en enfermos con GBM.^{8,12}

- **Índice Ki67.** El valor de este parámetro, representativo de la capacidad proliferativa de las células tumorales, ha demostrado en la actualidad tener una clara capacidad pronóstica y, en ocasiones, también predictiva de respuesta al tratamiento

antitumoral en múltiples neoplasias como el cáncer de mama, los sarcomas de partes blandas o los tumores neuroendocrinos, entre otros.^{134,135,136}

En el caso concreto de los gliomas y más aún de los GBM, los datos publicados son muy escasos. Parece claro que los tumores cerebrales de alto grado (AA o GBM) presentan un índice Ki67 superior a las neoplasias de bajo grado (astrocitomas de g.II). Sin embargo, no se ha establecido un punto de corte óptimo para que este biomarcador permita distinguir grupos pronósticos, existiendo notable variabilidad entre autores.¹³⁷

En nuestros pacientes el Ki67 está por debajo del 10% en más de la mitad de los casos (52%), siendo excepcionales los tumores con un valor por encima del 50% (11%). Esto concuerda con todas las publicaciones previas.

- **CD105 (endoglina) / CD31.** Estos dos marcadores endoteliales se relacionan íntimamente con el concepto de densidad de microvasos (DMV) en el tumor y en consecuencia con el proceso de neoangiogénesis, fundamental en la tumorogénesis. El primero de ellos se ha propuesto por algunos autores como un indicador más sensible que el CD31 para valorar este fenómeno biológico. Así los valores medios de CD105 en las tinciones de IHQ de muestras de gliomas son generalmente superiores a los obtenidos con el CD31.^{138,139} Esto último ocurre también en nuestro trabajo reforzándose así esta propuesta. Sin embargo según los datos de nuestra serie, y en oposición a lo ya publicado, a pesar de existir una correlación significativa entre los valores de CD31 y CD105 no ocurre lo mismo entre ambos marcadores y el Ki67. Esta discordancia podría explicarse porque en nuestro caso, al contrario que en las otras experiencias, el valor del Ki67 no ha sido recogido como una variable cuantitativa continua sino como un valor semicuantitativo o discretizado.

-**MGMT.** Nuestros datos, tanto en relación con la expresión de la proteína (IHQ) como con el silenciamiento del gen por metilación de su promotor (RT-PCR), son superponibles a los descritos en otras series clínicas y en el ensayo fase III de registro.^{61,128}

En todos los casos, existe un ligero incremento del porcentaje de tumores en los que la proteína finalmente no se expresa en comparación con las cifras de metilación del promotor en las mismas poblaciones. Este fenómeno se debe probablemente a la existencia de mecanismos alternativos al previamente descrito, eso sí menos frecuentes, que logran en ocasiones evitar la transcripción del gen por otras vías.

Como haremos con todas las demás variables, tanto clínicas como moleculares, la potencial implicación de la existencia o no de ambas o alguna de estas circunstancias, expresión de MGMT o metilación de su promotor, en términos de supervivencia de los enfermos será discutida en próximos apartados.

Como resumen de este apartado, se concluye que los enfermos con diagnóstico de GBM atendidos en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla entre los años 2000 y 2010, objeto de nuestro trabajo, representan una población con características clínicas y moleculares semejantes a otros grupos de pacientes descritos por otros autores. Asimismo, se les ha aplicado un tratamiento acorde con los estándares aún vigentes.

2. Objetivo segundo: Análisis de supervivencia. Búsqueda de variables pronósticas.

El pronóstico de los enfermos con GBM, aún con el empleo de las mejores opciones de tratamiento disponibles a día de hoy, es francamente malo. Tanto es así que en ocasiones se cuestiona la rentabilidad de algunas de las estrategias terapéuticas indicadas en este contexto clínico. Incluso se postula que para ciertos enfermos la alternativa más razonable podría consistir en un manejo exclusivamente sintomático.

La principal duda o inconveniente para tomar esta decisión está ligada al hecho de no saber identificar correctamente a los pacientes en los cuáles se debe plantear una limitación del esfuerzo terapéutico y, en contraposición, en quiénes debemos indicar maniobras terapéuticas más ambiciosas en busca de un claro beneficio clínico.

En este trabajo se han analizado múltiples características, tanto clínicas como moleculares, de los enfermos en busca de factores que permitan clasificarles en subgrupos pronósticos y así ayuden a orientar hacia la estrategia terapéutica más óptima en cada caso.

La supervivencia libre de recaída o progresión (SLRP) y la supervivencia global (SG) de los enfermos de nuestra serie son de apenas 4 y 8 meses respectivamente. Estando vivos al año, 18 y 24 meses, únicamente un 35, 18 y 9% de los pacientes.

Estas cifras son sensiblemente inferiores a las obtenidas por el grupo de Stupp en el ensayo fase III de registro^{56,57} e incluso a las recogidas en otras series clínicas de pacientes con GBM.^{128,129} Atribuimos esto a las diferencias existentes entre algunas de las principales características de nuestra serie y el resto de experiencias referidas. Así, por ejemplo, nuestros enfermos fueron sometidos únicamente a biopsia en un porcentaje mayor de casos en comparación con lo indicado en los pacientes incluidos en los ensayos (40 vs 17%). Este hecho, como veremos más adelante con detalle, es de por sí un factor influyente en los resultados alcanzados en términos de supervivencia de los enfermos con GBM. Además estos casos presentan también con mayor frecuencia otras características clínicas que los dotan de un peor pronóstico, como es el hecho de tener un peor PS al debut, y en consecuencia les privan de recibir posteriormente ciertos tratamientos, limitándose

así el esfuerzo terapéutico para este subgrupo. En definitiva, existen varias circunstancias que lastran la supervivencia de nuestra serie.

2.1 Variables relacionadas con los pacientes

Según el análisis univariante, la edad y el PS al diagnóstico son los factores pronósticos más relevantes. Así aquellos casos con un debut por debajo de los 60 años y un buen PS (0-1) presentan unas medianas de SLRP y SG significativamente mayores que el resto. Estos resultados son de nuevo consistentes con lo previamente reportado por la mayor parte de los investigadores en este contexto.^{128,129} Sin embargo hay series y modelos pronósticos, validados recientemente, que apuntan hacia los 50 años como punto de corte óptimo para establecer esta distinción pronóstica.^{89,90} Este último punto de corte no se ha confirmado en nuestra serie, quizás por ser en nuestro caso pocos los enfermos diagnosticados por debajo de esa edad, únicamente 30 casos.

Estas dos variables, PS y edad, al contrario de lo que a priori se podría pensar, no están correlacionadas entre sí en nuestra serie (test Chi-cuadrado y exacto de Fisher no significativos) por lo que en principio ambas tienen un impacto en términos de supervivencia de forma individualizada.

De forma sorprendente los pacientes con un hábito tabáquico moderado o importante, por encima de 10 paqs-años, presentan una mayor SLRP. Este teórico beneficio inicial no es capaz de traducirse posteriormente en forma de una mayor SG. Son muchos los datos publicados en relación con la capacidad de la nicotina para producir adicción mediante su unión a receptores colinérgicos específicos presentes en el SNC. Sin embargo, es muy escasa y poco conocida la información referente a otras potenciales propiedades farmacológicas de esta misma sustancia que pudiesen contribuir a potenciar determinados fenómenos implicados en la carcinogénesis como la estimulación de la proliferación, la angiogénesis o la inhibición de la apoptosis celular.¹⁴⁰ La implicación clínica definitiva de estos recientes modelos celulares está aún por aclarar. Nuestros resultados van en principio en contra de esta acción “protumoral” y por tanto contradicen dichos modelos. No se pueden descartar totalmente, al menos de forma teórica, posibles interacciones entre la acción de la nicotina a nivel de las células de los GBM y las de los fármacos antitumorales habitualmente empleados en estos enfermos, que pudiesen mediar un incremento de la actividad tumoricida de estos últimos. Sin embargo, es justo afirmar que, a pesar de haber realizado una búsqueda exhaustiva en este sentido, no somos conocedores de datos en la literatura que soporten esta hipótesis. Por otro lado, no es menos cierto que hasta la fecha los mecanismos previamente descritos se han referido fundamentalmente a tumores relacionados claramente con el hábito tabáquico como el cáncer de pulmón. En el caso de los GBM no existen datos a día de hoy para pensar en una relación directa entre el tabaquismo y el desarrollo de este tipo de neoplasias. Por último hay que considerar la posibilidad de que nuestros hallazgos se deban únicamente al azar, teniendo en

cuenta que el valor de la “p” en el análisis practicado en relación con esta variable está muy cercano al límite de la significación estadística (p 0,048).

Ninguna de las demás variables clínicas analizadas consigue clasificar de forma adecuada a los enfermos en subgrupos de mejor o peor pronóstico.

Hay grupos que sugieren una aparente mejor evolución de los pacientes que desarrollan un GBM a partir de la malignización de un glioma de bajo grado previamente existente.¹⁴¹ Este fenómeno, responsable de en torno a un 5% de los casos de GBM, generalmente está asociado con un mayor tiempo de evolución de los síntomas previos al diagnóstico de estos enfermos. Estas dos variables, a pesar de presentar prácticamente una duplicación de las medianas de SLRP y SG a favor del subgrupo con este perfil clínico, no han alcanzado diferencias significativas en el análisis univariante practicado en nuestra serie posiblemente otra vez por ser su representación muy escasa (solo 4 casos con glioma de bajo grado previo y 19 con sintomatología de más de tres meses de evolución al diagnóstico).

2.2 Variables relacionadas con los tumores

En este apartado han sido valorados dos parámetros, la localización y el tamaño tumoral.

La primera de estas dos variables tiene un claro valor pronóstico, presentando así los enfermos con tumores originados en los hemisferios cerebrales de nuestra serie una mayor SLRP y SG que aquellos pacientes con una localización a nivel del diencefalo (ganglios basales) o con GBM multicéntricos. Este dato no siempre ha logrado confirmarse como relevante a la hora de clasificar a estos enfermos en subgrupos pronósticos, comportándose los tumores multicéntricos de forma similar a las lesiones únicas en algunas de estas series clínicas.¹²⁸ Parece que tanto la localización a nivel de ganglios basales como la afectación multifocal están asociadas con un mayor número de biopsias y resecciones parciales, en concreto en nuestro caso practicadas en 17 y 2 de los 19 pacientes que conforman este subgrupo respectivamente, no existiendo ninguna resección completa. En estos casos las resecciones quirúrgicas más amplias no son técnicamente factibles. Este hecho condiciona sin duda una peor evolución de los enfermos como más adelante veremos.

El tamaño de los tumores, estimado mediante los test radiológicos diagnósticos, no tiene relevancia pronóstica en nuestra experiencia. Esto ocurre igualmente en otras series publicadas.¹²⁸

2.3 Variables relacionadas con los tratamientos

Las maniobras terapéuticas, que hasta la fecha se han demostrado claramente activas en este contexto clínico (cirugía, RT y QT), debiesen tener

consecuentemente un impacto fundamental en el retraso de la recaída o progresión tumorales y con ello en la supervivencia de los enfermos.

Tras el análisis univariante de los resultados obtenidos en nuestra serie, se puede afirmar que tanto el tipo de cirugía practicada, y el desarrollo o no de secuelas derivadas, como el empleo o no de RT y QT, con sus respectivas demoras desde la intervención, son todos ellos factores pronósticos relevantes en pacientes con GBM.

De este modo, los enfermos en los que, a criterio del neurocirujano, fue posible llevar a cabo una resección aparentemente completa del tumor tienen una mayor SLR (8 vs 2,5 meses) y SG (13 vs 4 meses) en comparación con los casos en los que solo se realiza una biopsia o una resección parcial de la lesión. Estas dos últimas maniobras quirúrgicas, biopsia y resección parcial, proporcionan una evolución clínica similar a los enfermos con GBM. El impacto en supervivencia de la extensión de la cirugía de este tipo de tumores no está del todo aclarado. Existen series clínicas niegan esta capacidad a la cirugía de intención radical^{27,128} y en contraposición hay otros grupos que afirman la existencia de un claro beneficio significativo de las resecciones subtotaes, incluso serían suficientes para ello extirpaciones por encima del 75 -80% del volumen tumoral.^{28,128} Nuestros resultados apoyan de forma clara a éstos últimos. En definitiva a día de hoy el objetivo de la cirugía en estos enfermos persigue una resección lo más amplia posible junto con una minimización del riesgo de causar secuelas neurológicas permanentes derivadas de ello.

En relación con estas secuelas postquirúrgicas, su desarrollo está asociado significativamente con un detrimento de la SLRP (5 vs 2 meses) y SG (10 vs 3 meses) de estos casos. Este hecho está posiblemente relacionado con el retraso y las dificultades que estas alteraciones pueden condicionar a la hora de plantear un inicio posterior del resto de las terapias habitualmente empleadas.

La demora media desde el diagnóstico radiológico hasta llevar a cabo un abordaje quirúrgico en nuestros pacientes es menor de 3 semanas. Este dato es similar a lo recogido por otros autores¹²⁸ y, con estos tiempos, no tiene impacto alguno en la evolución posterior de los mismos.

El empleo de fármacos anticomiciales en estos enfermos, indicados hasta en un 73% de los casos, parece incrementar de forma significativa su SLPR (5 vs 3 meses) y SG (10 vs 4 meses). Este dato pudiese justificarse por la potencial existencia de interacciones farmacológicas entre dichas drogas y los compuestos antitumorales, también usados de forma concomitante en esta población, que fuesen capaces de modular la eficacia obtenida por estos últimos. Existen así datos preclínicos y resultados derivados de análisis de subgrupos en pacientes de algunos ensayos que sustentan una potencial actividad sensibilizadora de las células de los GBM al tratamiento con temozolomida de ciertos fármacos anticonvulsivantes como el levetiracetam, el ácido valproico o la DFH. Esta acción, además de por cuestiones

farmacocinéticas, está posiblemente también ejercida mediante un silenciamiento de la expresión de MGMT alcanzado a su vez a través de un incremento en la metilación de su promotor descrito con el empleo de estas sustancias.^{142,143,144,145,146}

Según nuestros datos, los implantes de carmustina tópica en el lecho quirúrgico no aportan un claro beneficio en términos de supervivencia a estos pacientes. Este resultado está en línea con lo observado tras el seguimiento a largo plazo de los enfermos incluidos en el ensayo fase III con dicho compuesto.⁶³

El impacto en supervivencia asociado con la administración de la QT/RT posoperatoria con temozolomida en pacientes con GBM ha sido claramente demostrado mediante ensayos fase III.^{56,57} En nuestra serie se corrobora claramente el efecto beneficioso de dichas modalidades de tratamiento, existiendo así un incremento sustancial de la SLRP (6-7 vs 1 mes) y la SG (13 vs 2 meses) en aquellos enfermos que siguen esta estrategia terapéutica.

Son de especial relevancia clínica los resultados observados en relación con la influencia de las demoras desde la cirugía en el inicio de la RT y la QT en la evolución posterior de estos pacientes. Para el caso concreto de la RT, un retardo superior a las 42 días ha sido propuesto por la RTOG como deletéreo en términos de supervivencia.^{130,132} Este hecho se reproduce según los resultados observados en nuestra serie, presentando los enfermos con una espera superior a las 6 semanas una peor SLRP (3,5 vs 7 meses) y SG (6 vs 12 meses) en comparación con el resto de la población.

Del mismo modo, el inicio de la QT más allá de 1 mes tras la cirugía, afecta también de forma negativa a la SLRP (3 vs 7 meses) y SG (5 vs 12 meses) de los pacientes. Este hallazgo y punto de corte disponen, sin embargo, de menor soporte bibliográfico hasta la fecha.

En el total de la serie, el tiempo medio hasta inicio de la RT y QT fue de 53 y 34 días respectivamente, ligeramente superiores en principio a lo deseable, y por ello estos dos registros podrían ser parte de los motivos fundamentales por los que las cifras de supervivencia de nuestros enfermos son ligeramente inferiores a los de otras series.

2.4 Variables relacionadas con las características clínicas a la recaída o progresión

En el contexto prácticamente universal en nuestra serie de la recaída o progresión tumorales, tanto la situación general de los enfermos (PS) como el empleo de algún tipo de terapia razonable en ese contexto (rescate quirúrgico, RT o QT de segunda o posteriores líneas), van ligadas de forma evidente a un incremento significativo de la SG de los pacientes.

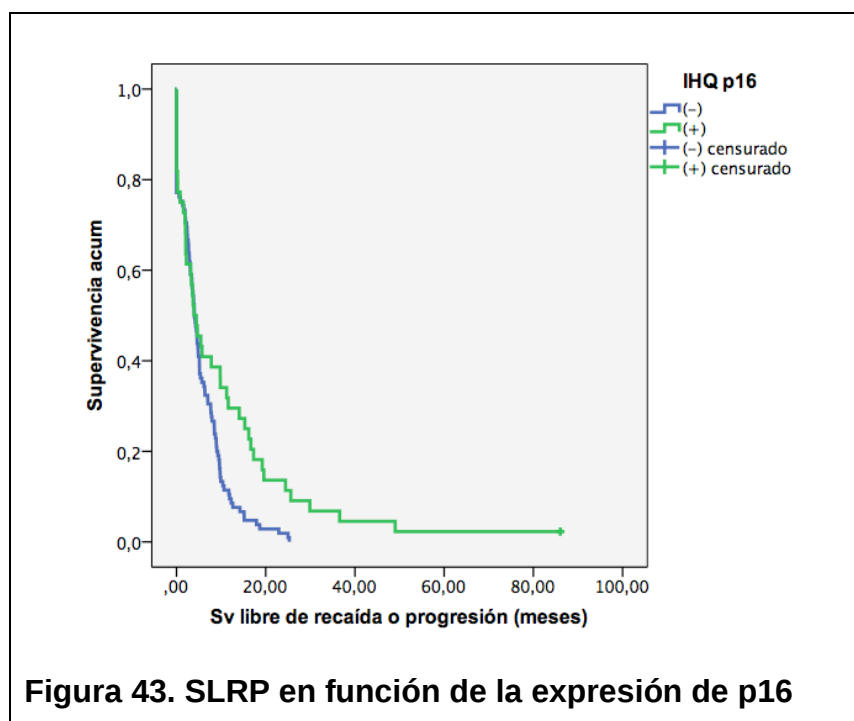
Estos datos están justificados por el beneficio clínico, probablemente de carácter marginal y restringido a subgrupos de pacientes muy seleccionados, que según algunos autores se obtiene con el empleo de dichas maniobras terapéuticas en este escenario clínico.^{33,47,74}

2.5 Variables relacionadas con las características moleculares

De todas las proteínas analizadas por su teórica implicación en el desarrollo del GBM, solo se encuentran dos asociaciones significativas:

- Expresión de p16 y aumento de SLRP de los enfermos, que no se traslada en un posterior aumento de la SG.
- Aumento por encima de la media de la expresión de los marcadores CD31 y CD105, con una mejor supervivencia.

Para el caso de p16, a pesar de ser las medianas de supervivencia estimadas por el modelo de Kaplan-Meier para ambas poblaciones (pacientes con o sin expresión de este marcador) similares, existe significación estadística y la curva de SLRP es más favorable para el caso de los enfermos que expresan esta proteína (Fig.43). Este resultado concuerda con lo sugerido por algunos autores que relacionan la pérdida de expresión de p16 con un peor pronóstico.^{147,148}



En cuanto a los otros factores referidos, se dispone de pocos análisis sobre el papel pronóstico de CD31 o CD105 en pacientes con gliomas agresivos, y resultan contradictorios con nuestras observaciones. Se ha sugerido que la sobreexpresión de CD105 acarrea un pronóstico desfavorable.^{149,150} Nuestros pacientes, por el

contrario, evolucionan mejor, tal vez porque los marcadores de angiogénesis quizás sean relevantes en la génesis del GBM, pero luego, cuando el tumor alcanza el máximo desorden molecular, la presencia de un incremento en la formación de neovasos ya carezca de significado pronóstico. Por ejemplo, como se ha visto en otras neoplasias, un tumor más vascularizado puede ser más quimiosensible y radiosensible, por mejor acceso de la quimioterapia al tumor y menos hipoxia intratumoral, respectivamente.¹⁵¹

En nuestra serie, ninguna otra proteína entraña valor pronóstico. Esto es habitual en la bibliografía, existiendo resultados fundamentalmente negativos o bien dispares que no han permitido consolidar hasta la fecha ningún biomarcador.¹⁵²

La metilación del promotor del gen MGMT no parece ser, según nuestros datos, un factor pronóstico relevante. Sin embargo, otros la han relacionado con mayor sensibilidad a temozolomida, con su consiguiente beneficio clínico.⁶¹ En relación con la técnica empleada para su determinación, la PCR, pensamos que la anterior discordancia puede ser principalmente explicada por las diferencias existentes entre las técnicas utilizadas en nuestro caso y las empleadas por los investigadores que demostraron su utilidad predictiva y pronóstica. Mientras que nosotros hemos realizado una determinación cuantitativa por RT-PCR, una parte importante de estos autores usa para este mismo propósito la PCR convencional específica para metilación con conversión por bisulfito.^{153,61} No está claro aún cuál de estas técnicas es la más adecuada para determinar los niveles de metilación del promotor de este gen con intención de obtener un correlato en términos pronósticos en esta población de enfermos. Los estudios llevados a cabo para comparar la utilidad, correlación y resultados de todas estas metodologías en este sentido son contradictorios.^{154,155,156,157,158}

Una técnica alternativa es la determinación por IHQ de la expresión de la enzima MGMT. En nuestras manos, sin embargo, tampoco ha servido para estimar el pronóstico, lo cual concuerda con otras experiencias que hasta la fecha descartan la utilidad de esa técnica.^{159,160,161}

Por último, en nuestro caso se han explorado varios puntos de corte para los niveles de metilación en busca de detectar su potencial utilidad pronóstica, sin obtenerse ningún éxito.

2.6 Asociaciones entre variables clínicas y tratamientos

La realidad de nuestra práctica clínica nos sugiere una asociación habitual y lógica de muchas de estas variables. Existiendo de esta forma ciertos perfiles clínicos que condicionan a su vez las actitudes terapéuticas posteriores.

Así en nuestra serie se corrobora una clara correlación entre la situación clínica del paciente en su debut y el tipo de cirugía practicada, realizándose más

biopsias en el grupo con un menor PS y más cirugías con resección aparentemente completa en los enfermos con PS 0-1. Ambas circunstancias se asocian en el análisis univariante con la evolución clínica de los pacientes. Para el caso concreto de las biopsias existe además un incremento significativo de la mortalidad posquirúrgica (21 vs 6 %).

También la edad superior a 70 años o la localización diencefálica y los tumores multicéntricos asocian una mayor tasa de biopsias como única alternativa de tratamiento quirúrgico empleado.

En el caso de la RT y la QT se observa como otra vez determinados perfiles clínicos, mejor PS o edad inferior a 70 años exclusivamente para el caso de la QT, incrementan el uso de estas alternativas. Este fenómeno de asociación de PS y tratamiento está aún más acentuado en el contexto de las recaídas o progresiones tumorales.

Muchas de estas agrupaciones entre las diferentes variables consideradas podrían dificultar la valoración individual del peso de cada una de ellas, así como de las interacciones existentes entre si, en la evolución clínica de los pacientes.

Este inconveniente se tratará de solucionar mediante la interpretación de los resultados del análisis multivariante que a continuación será discutido con mayor detalle.

2.7 Análisis multivariante (Regresión de Cox)

De entre las características de los enfermos que alcanzan una asociación significativa en el análisis univariante, solo el estado general del paciente (PS) conserva esta capacidad pronóstica en términos de SLRP y SG en el análisis multivariante. Por tanto, según nuestros hallazgos, parece consistente el hecho de que los enfermos con mejor PS en el momento del debut presentan una mejor evolución clínica posterior. Esto concuerda con la mayoría de lo publicado hasta la fecha.^{128,129} Más aún, este mismo parámetro en el momento de la recaída o progresión tumoral, de nuevo se muestra como determinante fundamental de la evolución clínica de estos pacientes.

Aunque en el análisis univariante la existencia de síntomas más allá de los 3 meses antes del diagnóstico no fue signo indicativo de una mejor evolución posterior, en el modelo multivariante este dato si va unido con un mayor tiempo a la progresión o recaída tumoral, que sin embargo posteriormente no se traduce en un incremento de la SG. Estos casos podrían corresponder con los enfermos que desarrollan un GBM a partir de otro tumor previo de bajo grado que sería la causa de dicha sintomatología y de su curso clínico más prolongado. Como ya se ha indicado previamente, hay autores que asocian este subgrupo de pacientes con un mejor

pronóstico quizás justificado por algunas de las diferencias patogénicas que estos tumores tienen en comparación con el resto de los GBM.¹⁴¹

La localización tumoral hemisférica se consolida también como un factor de buen pronóstico independiente según nuestros resultados, asociándose con esta característica una mayor SG de los enfermos.

En cuanto a las variables relacionadas con las terapias empleadas, los hallazgos del análisis multivariante apoyan un impacto favorable de una cirugía completa en comparación con la biopsia o resección parcial, al menos en forma de una mayor SLRP. También tiene relevancia el hecho de que se produzcan o no secuelas postquirúrgicas, ya que los pacientes que las presentan tienen un detrimento significativo en su SG, quizás asociado con una dificultad importante derivada para poder iniciar tratamiento con el resto de modalidades terapéuticas complementarias disponibles tras esta cirugía y su consiguiente impacto negativo.

La RT externa tiene un peso importante en los resultados de supervivencia obtenidos a largo plazo. Se corrobora así la utilidad de esta terapia, apoyada fundamentalmente por los resultados de los principales ensayos clínicos y revisiones llevadas a cabo hasta la fecha.^{34,35} Sin embargo, según los resultados del análisis multivariante no parece ser deletérea una demora de inicio superior a las 6 semanas de este tratamiento, como parecía insinuarse en base a los datos del log Rank test. Este punto de corte, propuesto por varios autores y asociaciones,^{130,132} precisa de ensayos específicos dirigidos a intentar aclarar esta cuestión que pensamos serán difíciles de llevar a cabo, por no ser en la actualidad un estándar el empleo de RT externa de forma exclusiva en este contexto.

En el caso de la QT sistémica, según los datos obtenidos por del análisis univariante su empleo en estos pacientes representa un claro beneficio en términos de supervivencia. De nuevo esto refuerza aún más el papel de la QT dentro del tratamiento de los pacientes con GBM. La regresión de Cox pone en este caso énfasis en la importancia de la demora de inicio para esta modalidad. Así cuando el tratamiento comienza más allá de los 30 días los enfermos sufren una merma en su SLRP y SG. Este aspecto no ha sido muy explorado hasta ahora de forma específica, quizás por el mismo argumento que anteriormente utilizamos para justificar la poco probable realización de ensayos con RT como tratamiento exclusivo para estos enfermos.

La única variable de carácter molecular que ha conseguido mantener su capacidad para seleccionar pacientes con una mayor SLRP, no así de SG, es la existencia de una tinción positiva para CD105 superior a la media. Las potenciales explicaciones para este resultado han sido ya discutidas previamente en este mismo apartado (ver punto 2.5, página 124).

3. Objetivo tercero: Análisis de subpoblaciones

La mayoría de los trabajos realizados en pacientes con este tipo de neoplasias reportan resultados conjuntos de supervivencia a largo plazo.^{57,128,129} En estas series, por ejemplo, tras una cirugía inicial el planteamiento terapéutico con QT o RT no está condicionado por la extensión de la resección practicada, a pesar de que como ya hemos visto este aspecto parece tener un claro impacto en el pronóstico de los enfermos. Es por ello que debiésemos plantearnos tener más en cuenta esta circunstancia, entre otras, a la hora de adecuar el esfuerzo terapéutico a seguir en cada caso. Sin embargo, a pesar de lo anterior, no existen prácticamente datos individualizados para estas subpoblaciones con pronóstico posiblemente muy distinto.

En base al similar comportamiento clínico y evolutivo observado en nuestro trabajo entre los casos en los que la cirugía fue parcial o únicamente fueron biopsiados y sus claras diferencias con aquellos pacientes sometidos a una resección completa del tumor, se ha decidido analizar estas subpoblaciones de forma independiente en busca de una justificación subyacente para estas observaciones.

3.1 Pacientes con resección tumoral completa

Este subgrupo corresponde con un 39% (66 casos) de la serie global. Sus características reflejan un grupo de pacientes que presentan una mejor situación general en el momento de ser diagnosticados y quizás por ello reciben un tratamiento óptimo en mayor proporción que lo observado en la serie global.

Desde un punto de vista clínico, estos enfermos presentan con mayor frecuencia un PS 0-1 en su debut, siendo su demora diagnóstica sensiblemente inferior y, posiblemente como consecuencia de esto, sus tumores menos voluminosos.

Dentro de esta subpoblación, no hay tumores de asiento diencefálico ni de presentación multicéntrica. En estos casos, como se ha mencionado previamente, no es técnicamente factible una resección completa. La demora hasta la cirugía es menor y, a pesar de practicarse resecciones en principio más extensas, la mortalidad es bastante más baja (2 vs 10%). De nuevo este último resultado pudiese estar ligado con una mejor situación clínica de los pacientes en ese momento.

El empleo de anticomiciales es mayor que en el resto de la serie probablemente por utilizarse habitualmente estos fármacos con intención profiláctica tras la cirugía con vistas a evitar complicaciones y facilitar así el inicio precoz de otras modalidades de tratamiento complementario.

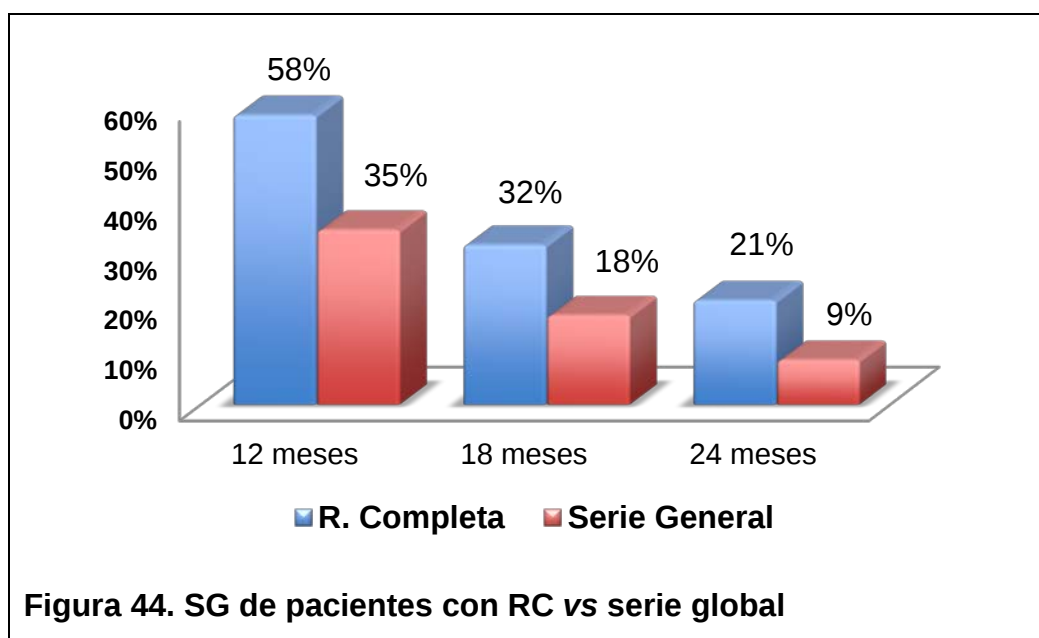
En la misma línea, tanto la RT como la QT tópica y sistémica se indicaron en un mayor número de enfermos en este subgrupo. Teniendo en cuenta que todas

estas alternativas de tratamiento han demostrado ser beneficiosas en este contexto clínico, esto pudiese tener un impacto relevante en la supervivencia de estos pacientes. Las demoras de inicio de todas ellas han sido similares a las del grupo general.

En el momento de la recaída, de nuevo el PS de este subgrupo es sensiblemente mejor que el de la serie general (PS 0-1; 44 vs 26%). Este factor condiciona sin duda un mayor número de maniobras terapéuticas posteriores (rescate quirúrgico 22 vs 8%; QT de 2ª línea 46 vs 27%; QT de 3ª y posteriores líneas 9 vs 5%), con su consiguiente impacto en la evolución clínica. Los porcentajes de indicación de tratamiento activo en 2ª y posteriores líneas son similares a los recogidos en series clínicas publicadas, coetáneas a la nuestra.¹²⁹

Por último reseñar que, como era de esperar, no existen diferencias significativas en relación con las características moleculares observadas en los tumores de este subgrupo y los de la serie completa. Esto es lógico ya que dichas características provienen de los resultados del análisis de la muestra tumoral obtenida durante la cirugía y por tanto no se conocen antes de la misma, por lo que es imposible que puedan condicionar este abordaje.

Como consecuencia de todo lo anterior, tanto la supervivencia libre de recaída (8 vs 4 meses) como la SG (13 vs 8 meses) de este subgrupo de pacientes supera a la observada en la serie global, duplicándose prácticamente las tasas de supervivencia al año, 18 y 24 meses (Fig.44). A pesar de existir diferencias entre ambas poblaciones, estos resultados se acercan más a los publicados por el grupo de Stupp en el ensayo fase III de registro.^{56,57}



El análisis univariante en esta subpoblación reproduce lo observado en la población general. De este modo, con mínimas excepciones como la del hábito

tabáquico, el empleo de anticomiciales o el desarrollo de secuelas tras la cirugía, las variables clínicas y moleculares asociadas de forma significativa con la SLR y SG de estos enfermos se superponen con las ya discutidas para el total de la serie.

En este subgrupo de pacientes la utilización o no de QT sistémica, complementaria o tras la recaída tumoral, y el tiempo hasta su inicio tras la cirugía han sido ambas variables con un impacto significativo en la supervivencia de los enfermos en el análisis multivariante. Estos datos consolidan el beneficio observado en los ensayos clínicos de registro con esta modalidad terapéutica.^{57,74}

El PS en el momento de la recaída también emerge en el modelo de Cox como una característica relevante para identificar enfermos de mejor pronóstico. Esta circunstancia podría conducir a recomendar tratamiento activo tras la reaparición del tumor, por ejemplo con QT de 2ª línea, y con ello dar lugar a una mayor SG de estos pacientes.

En relación con las características moleculares, como en la serie global, el modelo regresivo multivariante asocia la expresión de p16 de forma significativa con una mayor SLR. Además, los pacientes con una ausencia de metilación del promotor con un punto de corte en el 30% de este subgrupo, y en contra de lo sucedido en la serie global, tienen mejor SG. Este resultado, como ya se ha comentado, está en línea lo referido por la mayoría de autores, quienes sugieren que la metilación del promotor de MGMT proporciona mayor sensibilidad a la temozolomida.⁶¹

3.2 Pacientes con biopsia o resección tumoral parcial

Este subgrupo representa un 61% (103 casos) de la serie global. En este caso generalmente se trata de enfermos con una situación clínica desfavorable que condiciona un abordaje terapéutico subóptimo y por ello presenta una peor evolución clínica.

En línea con lo anterior, de entre las características clínicas y tumorales destaca un peor PS al diagnóstico en comparación con la serie global (PS 0-1; 64 vs 74%). En este subgrupo están incluidos todos los casos de tumores con localización diencefálica y multicéntricos. Este es un hecho relevante ya que, como hemos visto, estos tumores habitualmente no se pueden resecar de forma completa y presentan por ello un peor pronóstico. El resto de variables son similares a las descritas en la serie completa.

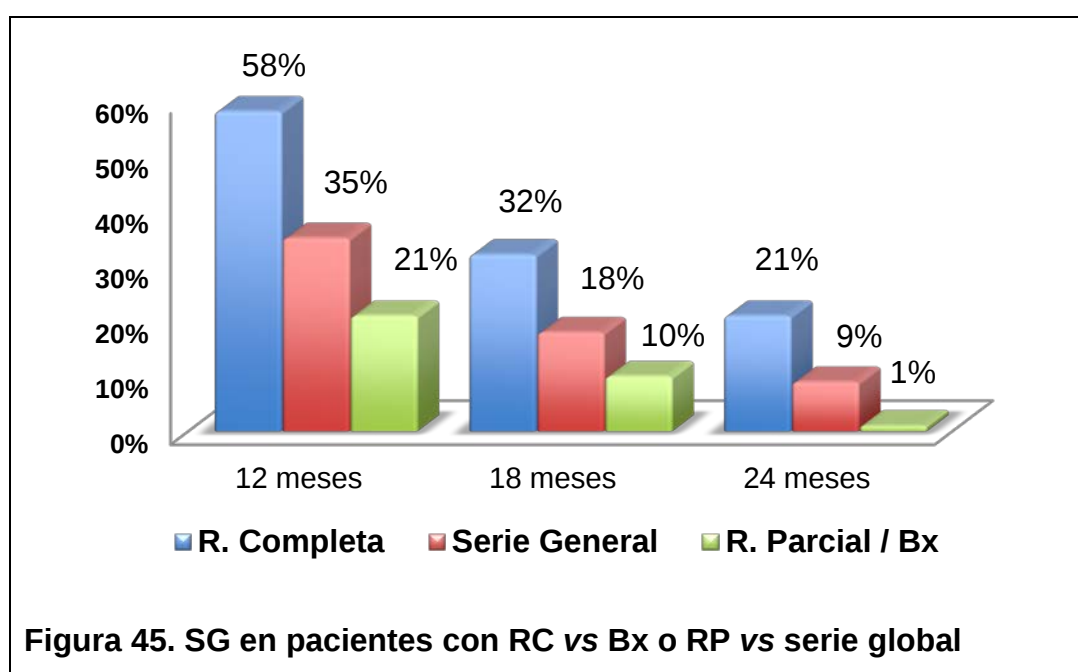
En referencia a los aspectos relacionados con la cirugía, resalta aquí un incremento de la mortalidad postoperatoria (16 vs 10%). Este dato podría explicarse porque en muchos casos la biopsia no fue realizada con control estereotáxico y también porque la situación clínica basal era más desfavorable. Adicionalmente, menos enfermos recibieron anticomiciales (63 vs 72% en la serie global), pudiendo este hecho también deteriorar su supervivencia.

Otra razón que justifica una peor SLP y SG es que la indicación de RT y QT se ve claramente disminuida en este grupo respecto a la serie general (RT; 47 vs 63% y QT; 53 vs 63%).

Como cabía esperar, a la progresión tras una primera tentativa terapéutica, el estado general está más deteriorado (PS 0-1; 15 vs 26%). En ningún caso fue factible una cirugía de rescate y asimismo fue excepcional la indicación de QT de 2ª y sucesivas líneas (14% y 2% respectivamente). Estos hechos contribuyen posiblemente al peor devenir clínico observado en este subgrupo.

De nuevo, como en el caso de los enfermos con resección completa, las características moleculares de los tumores en este subgrupo son superponibles a las descritas para el total de la serie.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente descrito, es fácil justificar la pobre SLP y SG obtenidas en esta subpoblación, 2 y 4 meses respectivamente. También la proporción de pacientes vivos al año, 18 y 24 meses (21, 10 y 1%) es claramente menor que la alcanzada en el total de la serie (Fig.45). No existen datos muy específicos en la literatura en relación a la supervivencia de enfermos con biopsia o resección parcial del tumor ya que en la mayoría de las series estos casos son analizados en conjunto con el resto de pacientes.^{128,129}



En el análisis univariante practicado en esta subpoblación, se mantienen la significación y consecuente asociación con la supervivencia de las principales variables clínicas relacionadas con pacientes, tumores y tratamientos previamente detectadas en la serie completa. Dejan de ser relevantes únicamente en esta población la edad, el hábito tabáquico y el empleo de anticomiciales. Aparece como

única novedad el hecho de que un debut en forma de déficit neurológico parece condicionar una progresión más precoz en comparación con el resto de los síntomas en el momento del diagnóstico. Esto pudiese estar asociado con un menor esfuerzo terapéutico realizado en esta situación tan desfavorable en la que pacientes con un mal estado general presentan además alteraciones neurológicas importantes.

Para el caso concreto de la SG, tras la progresión tumoral, el PS y la QT de 2ª línea mantienen su asociación con la supervivencia pero sin embargo, el empleo de QT de 3ª línea no parece aportar nada, aunque ésta fue una maniobra muy poco utilizada en este contexto.

Por último, este tipo de análisis, no observa relación significativa alguna entre las características moleculares analizadas y la supervivencia, tanto SLP como SG.

En el análisis multivariante, una demora diagnóstica superior a los 3 meses aparece de nuevo como un factor favorable en términos de SLP, quizás como ya hemos mencionado, por corresponderse estos casos probablemente con GBM desarrollados a partir de gliomas de bajo grado previos que parecen tener una evolución más ralentizada.¹⁴¹ Este resultado, sin embargo, no se ha corroborado en la serie global y tampoco lo ha hecho en los pacientes con resección completa, pudiéndose quizás considerarse como específico para este subgrupo de enfermos.

Según la regresión de Cox, el desarrollo de secuelas postquirúrgicas condiciona, al igual que en el total de la serie, una peor evolución de los enfermos. Tanto el empleo de fármacos antiepilépticos, como la administración de RT y QT sistémica impactan en la SG de estos pacientes, aunque solo la RT parece tener también efecto significativo a la hora de retrasar la progresión tumoral.

Finalmente, de entre todas las variables moleculares, la expresión aumentada por IHQ de MGMT o la disminución de CD31, eso sí únicamente para el caso de la SLP, parecen según este modelo asociarse con una progresión tumoral acelerada o un peor pronóstico.

En el caso de la MGMT, la mayor expresión de este enzima, con capacidad detoxificadora que teóricamente contrarresta el efecto antitumoral de la temozolomida, aparece únicamente en este grupo de enfermos como factor pronóstico significativo, no habiéndose demostrado esto en el resto de pacientes. No obstante, existen dudas acerca de la capacidad de este método de determinación para detectar pacientes con una mejor evolución clínica, siendo los resultados en este sentido hasta la fecha como ya se ha mencionado dispares.^{159,161}

Tanto CD31 como CD105 son marcadores que detectan la presencia de microvascularización tumoral y además sus niveles de expresión están correlacionados (ver punto 3 del apartado de resultados, pag 70), por tanto su comportamiento en términos de utilidad pronóstica debiese ser similar. En este

sentido, el aumento de sus niveles de expresión se ha relacionado en ambos casos con un mal pronóstico de estos enfermos.^{149,149} Los motivos potenciales por los que el aumento de expresión de CD31 puede dar lugar a una mejor evolución clínica, y por tanto su disminución a su vez a un peor pronóstico, son superponibles a los ya discutidos en el apartado 2.5 (página 124) de este mismo trabajo a propósito de los hallazgos en relación con CD105. Los últimos resultados obtenidos con CD31 en este subgrupo apoyan esta hipótesis. Sin embargo, si se tiene en cuenta que este marcador vascular no alcanzó la significación estadística en el análisis univariante practicado en esta misma subpoblación y que la justificación de los mecanismos subyacentes en términos biológicos es al menos cuestionable, quizás debiésemos considerar esta potencial asociación con cierto escepticismo.

Finalmente, como resumen de este apartado se podría afirmar que, en base a todos estos resultados, en este escenario tan desfavorable los factores clínicos, como el PS o la sintomatología, y los tratamientos utilizados adquieren protagonismo y en contraposición otro tipo de aspectos en relación con el tumor, incluidas las características moleculares, son menos relevantes.

4. Objetivo cuarto: Creación de redes bayesianas

Cabe destacar en primer lugar la gran capacidad expresiva y de síntesis observada en relación con el empleo de este tipo de modelos probabilísticos para el análisis de las variables. Así las RB, como se ha visto a lo largo de nuestro trabajo, gracias al grafo obtenido y las relaciones establecidas entre sus nodos, son capaces de recoger de forma muy simple e intuitiva los resultados clínicos obtenidos. No solo eso, además una vez aprendido o entrenado el modelo, como se ha visto en nuestros experimentos, también son capaces de generar una serie de probabilidades teóricas para cada una de las variables de interés en función del conocimiento disponible en relación con el resto. Más aún, esto se logra con esta herramienta de una forma dinámica, es decir, en base a las posibles variaciones en la disponibilidad de dicha evidencia en cualquier fase del seguimiento.

Ya por la primera de estas virtudes, varios investigadores han utilizado estos modelos para identificar subgrupos pronósticos en distintas neoplasias, principalmente hasta ahora en función de la expresión génica en tejido tumoral por técnicas de secuenciación masiva.^{100,101,102,103}

En nuestras manos, estos modelos son consistentes con la ausencia de relaciones significativas entre las variables moleculares y la SG, como otros han descrito.^{152,158,160}

Por otro lado, las redes “total y clínica”, tienen una más que aceptable capacidad para clasificar al paciente en distintas franjas de supervivencia (precisión

o tasa de aciertos en torno al 70-75%, mayor aún en los casos extremos, con supervivencia menor de 12 o mayor de 24 meses).

La probabilidad a priori de ser un largo superviviente sugerida por estas redes es superponible a la del análisis convencional, utilizando tan solo información clínica. La pericia de los modelos (AUC de la curva ROC), a diferencia de la precisión o tasa de acierto, expresa la habilidad del test para identificar esa eventualidad, por más infrecuente que sea. En todos nuestros experimentos, la pericia está por encima de 0,85-0,9, lo que en biomedicina se considera “bueno o muy bueno”.¹²⁶

A la inversa, estos modelos pueden ser empleados para determinar las variables con mayor trascendencia a la hora de modificar la probabilidad para alcanzar un determinado objetivo. Por ejemplo, en nuestro caso, identificar cuáles son las características clínicas o tratamientos con más influencia en la SG. Estas características estarán definidas por el *Markov blanket* de cada nodo o variable objetivo en la red.

Debemos resaltar los resultados alcanzados con la “red clínica” en comparación con la “total”, pues a pesar de tener menos precisión, resulta superior para identificar largos supervivientes. En este modelo, el PS a la recaída o progresión tumoral tiene un gran impacto sobre el devenir clínico. Como ya se ha mencionado, esto podría ser debido a que solo los enfermos con una situación general conservada en ese momento evolutivo, pacientes muy seleccionados, serían los que reciben finalmente tratamientos de segunda y posteriores líneas, alcanzándose así en ellos una mayor SG (ver 2.4, página 123).

Estos últimos resultados son, al menos, provocadores ya que cuatro de las cinco variables que componen el *Markov blanket* para la SG en esta red clínica son de fácil acceso y están generalmente disponibles desde la primera consulta, incluso antes de la cirugía. Por ello, se sugiere la utilidad de estas características como ayuda para tomar decisiones terapéuticas ulteriores y postulamos que las RB serían una herramienta con aplicación clínica directa.

Sin embargo, es justo subrayar que estas hipótesis deben ser tomadas con cautela ya que, aunque las redes han sido generadas y entrenadas con datos clínicos reales, los parámetros de eficacia de dichas herramientas (precisión y pericia) se generan a partir de poblaciones simuladas. También es cierto que estos valores, en concreto los de precisión, son superponibles a los observados tras el análisis de los “casos prueba”, no implicados en la generación de los modelos probabilísticos.

VI. Conclusiones y líneas futuras

VI. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

1. Conclusiones de la Tesis

1. Los enfermos con diagnóstico de GBM atendidos en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla entre los años 2000 y 2010 representan una población con características clínicas y moleculares semejantes a las descritas en la bibliografía. Asimismo, se les ha aplicado un tratamiento acorde con los estándares aún vigentes.

2. Observamos medianas de SLRP y SG (4 y 8 meses respectivamente) sensiblemente inferiores a las descritas en los ensayos de registro y otras series clínicas.

2a. De los factores clínicos, la edad inferior a 60 años y el PS 0-1 al diagnóstico auguran mejores SLRP y SG. A la recaída, retiene peso favorable el PS 0-1. Por el contrario, comportan peor evolución los tumores profundos y muticéntricos. Con respecto al impacto de la cirugía, la resección completa sin secuelas representa el mejor subgrupo en términos de SLRP y SG. La resección parcial y la biopsia dan lugar a un mal pronóstico. El empleo de RT externa y QT sistémica, con temozolomida, aportan un claro beneficio en términos de SLRP y SG. Una excesiva demora en aplicar ambas modalidades resulta perjudicial.

2b. No observamos ningún rasgo molecular que permita estimar el pronóstico de estos enfermos, por lo que no recomendamos su empleo en el ámbito asistencial.

3. Existen dos subpoblaciones claramente diferenciadas desde el punto de vista clínico. Por un lado están los enfermos con resección completa, que poseen rasgos clínicos basales más favorables, reciben tratamiento antitumoral con más frecuencia y tienen mejor supervivencia. En cambio, aquellos enfermos con una resección parcial del tumor o una biopsia muestran el perfil opuesto. Sin embargo, las características moleculares no permiten distinguirlos.

4. Las RB proporcionan una visión muy sintética, dinámica y expresiva del pronóstico del GBM. Solo con variables clínicas disponibles en un primer contacto ofrecen gran capacidad para identificar largos supervivientes. Las características moleculares no aportan información relevante en estos modelos.

2. Líneas futuras de investigación.

Al margen de los problemas metodológicos habitualmente asociados con una recogida retrospectiva de datos y con las diferentes técnicas empleadas durante las

determinaciones moleculares, causantes ambos de pérdidas de información, la principal limitación de este trabajo está principalmente ligada al escaso tamaño de la población analizada.

Así visto, la principal línea de investigación en un futuro consistiría en intentar incorporar a nuestra serie datos de un mayor número de enfermos con GBM, incluso de forma prospectiva. Debiésemos tratar además de minimizar estas pérdidas de información en la medida de lo posible.

De este modo, por ejemplo, se podrían quizás considerar para el análisis otras variables, principalmente moleculares, de potencial interés en este contexto. Más aún, en el caso concreto de las características ya estudiadas, sería también factible la recogida de múltiples categorías o estados para cada una de estas variables, sin ser necesaria la dicotomización de las mismas. Así se exploraría la potencial existencia de categorías “intermedias” que pudiesen guardar una relación significativa con la supervivencia de estos pacientes.

En relación con las RB, una mayor cantidad de información daría lugar a un apredizaje o entrenamiento del modelo más óptimo. Por otra parte, al disponer de más casos reales, se podrían reservar sin problemas inicialmente cohortes más amplias de validación, evitandose así la necesidad de generar series virtuales de pacientes destinadas a este propósito.

Índice de tablas

Tabla I. Gradación OMS de los tumores del SNC	10
Tabla II. Sistemas de clasificación pronóstica en GBM	29
Tabla III. Características de los pacientes.....	43
Tabla IV. Características de los tumores.....	45
Tabla V. Características de los tratamientos utilizados	45
Tabla VI. Características a la recaída o progresión.....	47
Tabla VII. Características moleculares	49
Tabla VIII. Variables dicotomizadas	55
Tabla IX. Categorización de variables para RB.....	61
Tabla X. QT de primera línea	71
Tabla XI. Terapia sistémica de 2ª y posteriores líneas.....	72
Tabla XII. Variables de los pacientes (SLRP).....	76
Tabla XIII. Variables de los tumores (SLRP)	77
Tabla XIV. Variables relacionadas con los tratamientos (SLRP).....	77
Tabla XV. Variables moleculares (SLRP).....	78
Tabla XVI. Análisis multivariante (SLRP)	79
Tabla XVII. Variables de los pacientes (SG).....	80
Tabla XVIII. Variables de los tumores (SG).....	81
Tabla XIX. Variables relacionadas con los tratamientos (SG)	81
Tabla XX. Variables a la recaída o progresión (SG).....	82
Tabla XXI. Variables moleculares (SG)	83
Tabla XXII. Análisis multivariante (SG).....	84
Tabla XXIII. Características clínicas de pacientes con RC.....	87
Tabla XXIV. Características moleculares de pacientes con RC	88
Tabla XXV. Análisis univariante en pacientes con RC	90
Tabla XXVI. Análisis multivariante en pacientes con RC (SLR)	91
Tabla XXVII. Análisis multivariante en pacientes con RC (SG)	92
Tabla XXVIII. Características de pacientes con Bx o RP	92
Tabla XXIX. Características moleculares de pacientes con Bx o RP	93
Tabla XXX. Análisis univariante en pacientes con Bx o RP	95
Tabla XXXI. Análisis mutivariante en Bx o RP (SLP)	96

Tabla XXXII. Análisis multivariante en Bx o RP (SG)	97
Tabla XXXIII. Tabla de contingencia (Experimento 2). Red total.....	103
Tabla XXXIV. Tabla de contingencia (Experimento 3a). Red total	104
Tabla XXXV. Tabla de contingencia (Experimento 3b). Red total (RC).....	105
Tabla XXXVI. Tabla de contingencia (Experimento 5). Red clínica	108
Tabla XXXVII. Tabla de contingencia (Experimento 6) Red clínica	108
Tabla XXXVIII. Tabla de contingencia (Experimento 7) Red clínica	109

Índice de figuras

Figura 1. Glioblastoma multiforme (Hematoxilina eosina)	11
Figura 2. Vías y genes implicados en la génesis de los GBM	15
Figura 3. Alteraciones genéticas en GBM primarios y secundarios.....	16
Figura 4. Imágenes radiológicas de GBM.....	18
Figura 5. Planificación de RT externa.....	22
Figura 6. Sistema NovoTTF-100A	28
Figura 7. Esquema de un sistema inteligente	31
Figura 8. Red bayesiana.....	33
Figura 9. Markov blanket (área sombreada).....	34
Figura 10. Fragmento de microarray	48
Figura 11. Determinaciones de inmunohistoquímica (IHQ)	52
Figura 12. <i>Kit One Step qMetil®</i>	53
Figura 13. RT-PCR de las muestras de ADN (esquema)	54
Figura 14. Distribución por sexos y PS.....	67
Figura 15. Síntomas al debut.....	68
Figura 16. Topografía de los tumores en SNC	68
Figura 17. Tipo de cirugía.....	69
Figura 18. PS a la recaída o progresión	71
Figura 19. Tratamiento a la recaída o progresión.....	72
Figura 20. Determinaciones IHQ	73
Figura 21. Nº vasos CD31 + y CD 105 +	74
Figura 22. Análisis de MGMT	75
Figura 23. SLRP y SG	75
Figura 24. Supervivencia global	76
Figura 25. Relación PS y cirugía	84
Figura 26. Relación edad y cirugía	85
Figura 27. Relación localización y cirugía	85
Figura 28. Relación PS y tratamiento con RT/QT.....	86
Figura 29. Relación edad y QT sistémica.....	86
Figura 30. SLR y SG de pacientes con RC	89
Figura 31. Supervivencia global de pacientes con RC	90

Figura 32. SLP y SG de pacientes con Bx/RP	94
Figura 33. Supervivencia de pacientes con Bx/RP	95
Figura 34. Red total	98
Figura 35. Probabiliad de SG a priori (Red total)	99
Figura 36. Curva ROC (Experimento 3a). Red total	104
Figura 37. Curva ROC (Experimento 3b) Red Total (RC).....	105
Figura 38. Red clínica.....	106
Figura 39. Probabilidad de SG a priori (Red clínica).....	106
Figura 40. Curva ROC (Experimento 6) Red clínica.....	109
Figura 41. Curva ROC (Experimento 7) Red clínica.....	110
Figura 42. Red molecular	110
Figura 43. SLRP en función de la expresión de p16	124
Figura 44. SG de pacientes con RC vs serie global	129
Figura 45. SG en pacientes con RC vs Bx o RP vs serie global.....	131

ANEXO 1. Protocolo de inmunohistoquímica

Los pasos seguidos durante este proceso son los que a continuación se describen:

1. Recogida de material en parafina (selección de bloques)
2. Realización de cortes de 5 micras recogiendo el material en portas especiales para inmunohistoquímica y un corte teñido con Hematoxilina-Eosina de control.
3. Secado en estufa y desparafinado de los cortes mediante incubación de los microarrays a 60° y posterior realización de varios baños en xilol.
4. Recuperación de antígenos, en el PTLINK, con Buffer a pH alto o bajo según especificaciones técnicas requeridas por la ficha de cada anticuerpo (Target Envision Retrieval Solution Low/High pH Dako®), durante 20 minutos a 90° y después se pone la muestra a atemperar.
5. Técnica inmunohistoquímica. Realizada automáticamente en teñidor AUTOSTAINER LINK48 de Dako®.
 - a) Realizar lavados.
 - b) Eliminación de Peroxidasa endógena, 5 minutos (Flex Peroxidase Block Dako®)
 - c) Lavados
 - d) Aplicación del Anticuerpo Primario: incubación de 20 minutos a temperatura ambiente.
 - e) Lavados
 - f) Sistema de visualización, 15 minutos/20 minutos (Envision Flex/HPP Dako ®)
 - g) Lavados
 - h) Añadir cromógeno (Diaminobencidina), 10 minutos (Flex DAB Substrate Working Solution Dako ®)
 - i) Lavados
 - j) Tinción de contraste con Hematoxilina, 5 minutos (Envision Flex Hematoxylin-Dako®)
 - k) Lavados
 - l) Montaje alcohólico (previa deshidratación: alcohol de 96°, alcohol de 100° y xilol)
6. Interpretación de los resultados (lectura con microscopía óptica).

ANEXO 2. Extracción con *DNA sample preparation kit*

(COBAS. ROCHE Diagnostic)

Los pasos a seguir para realizar esta técnica están descritos a continuación:

- 1) Depositar las 5 secciones seleccionadas de 5 micras de tejido en un tubo eppendorf rotulado con 500 µl de xileno. Mezclar por agitación durante 10 segundos. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 2) Añadir 500 µl de etanol absoluto y mezclar por vórtex durante 10 segundos. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 3) Centrifugar a 16.000g durante 3 minutos y descartar el sobrenadante sin tocar el precipitado. Si está flotando, centrifugar de nuevo durante 1 minuto.
- 4) Añadir 1 ml de etanol absoluto y mezclar por vórtex durante 10 segundos. Centrifugar a 16.000g durante 2 minutos y descartar el sobrenadante sin tocar el pellet. Si está flotando, centrifugar de nuevo durante 1 minuto a la misma velocidad.
- 5) Secar el pellet en un termobloque a 56°C al menos durante 10 minutos, con los tubos abiertos, para que se evapore el etanol.
- 6) Resuspender en 180 µl de DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB) y 70 µl de proteinasa K (PK). Vórtex de cada tubo con tejido y TLB/PK durante 30 segundos. Verificar que el tejido está sumergido en el líquido.
- 7) Incubar a 56°C durante 2 horas.
- 8) Vórtex del tubo durante 10 segundos. Verificar que el tejido está sumergido en el líquido. Incubar a 90°C durante 1 hora.
- 9) Durante esta incubación, preparar el número necesario de tubos con filtro junto con sus tubos de desecho, y rotularlos correctamente con la identidad de la muestra en el tapón del tubo con filtro. Rotular adicionalmente un tubo eppendorf de 1,5 ml por cada muestra para recoger el extraído final.
- 10) Retirar los tubos del termobloque a 90°C, atemperar durante 5 minutos.
- 11) Realizar un pulso de centrifuga durante 3 segundos. Añadir 200 µl de DNA Paraffin Binding Buffer (DNA PBB) y homogeneizar mediante pipeteo. Asegurarse visualmente que la solución sea homogénea. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 12) Añadir 100 µl de isopropanol y homogeneizar mediante pipeteo. Transferir todo el líquido del tubo mediante pipeteo a la columna.

- 13) Centrifugar a 8.000g durante 1 minuto. descartar el tubo de desecho, y sustituirlo por uno nuevo.
- 14) Añadir 500 µl de Wash Buffer I a la columna. Centrifugar a 8.000g durante 1 minuto. Descartar el líquido del tubo de desecho.
- 15) Añadir 500 µl de Wash Buffer II a la columna. Centrifugar a 8.000g durante 1 minuto. Descartar el tubo de desecho, y sustituirlo por uno nuevo.
- 16) Centrifugar a 16.000g durante 1 minuto. Descartar el tubo de desecho y colocar la columna sobre el tubo eppendorf rotulado.
- 17) Añadir 50 µl de DNA Elution Buffer (DNA EB) en el centro del filtro, sin tocarlo. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifugar a 8.000g durante 1 minuto para recoger el DNA extraído en el tubo eppendorf.
- 18) Repetir el paso 17 en caso de requerir más volumen.
- 19) Desechar la columna.

ANEXO 3. Variables no significativas en el análisis de supervivencia de subpoblaciones específicas

Pacientes con resección tumoral completa (RC)				
Variable (n)	Mediana SLR meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)
Sexo				
- Hombre (40)	8,4 (7 – 9,9)	0,8	12,9 (11,8 – 14,1)	0,9
- Mujer (26)	6,3 (3,2 – 9,5)		12,4 (8,2 – 16,6)	
Edad (años)				
< 50 (14)	10,4 (5,8 – 15)	0,2	22,2 (8,7 – 35,6)	0,3
> 50 (52)	7,7 (5,8 – 9,6)		12,4 (9,6 – 15,2)	
Tabaco (paqs-años)				
- No/Ex/<10 (42)	6,1 (3,8 – 8,4)	0,2	10,5 (7,4 – 13,7)	0,7
- Fuma 10-20/>20 (22)	9,6 (8,1 – 11,2)		14,5 (4,6 – 24,4)	
Alcohol				
- No/Ex (57)	8,1 (5,4 – 10,8)	0,4	13,3 (10,9 – 15,7)	0,09
- Bebedor >40 (7)	8 (5,6 – 10,3)		12,3 (10,7 – 13,9)	
Clínica Debut				
- Déficit (46)	7,7 (5,6 – 9,7)	0,6	12,4 (9,3 – 15,5)	0,5
- Otros (20)	8,9 (8,6 – 9,2)		15,7 (10,4 – 21,1)	
Demora Dx (días)				
< 90 (60)	7,8 (6 – 9,6)	0,9	12,4 (10,9 – 13,9)	0,9
> 90 (6)	7,7 (2,3 – 13,1)		16,6 (10,2 – 23)	
Tamaño (cm)				
< 4,3 (32)	5,1 (3 – 7,2)	0,3	10,5 (5,7 – 15,4)	0,9
> 4,3 (34)	9 (8 – 10,1)		13 (12,5 – 13,6)	
Demora a IQ (días)				
< 19,6 (49)	7,7 (4,7 – 10,6)	0,08	13 (12 – 13,9)	0,5
> 19,6 (17)	9,6 (6,2 – 13)		12,4 (3,7 – 21,2)	
Secuelas de IQ				
- No (52)	8,7 (6,9 – 10,6)	0,1	13,1 (11 – 15,4)	0,2
- Sí (14)	5,2 (<1 – 12,3)		9,5 (<1 – 22,5)	
Anticomiciales				
- No (10)	7 (2 – 12)	0,6	9,9 (2 – 17,8)	0,9
- Sí (56)	7,8 (6,1 – 9,6)		12,8 (11,8 – 13,8)	
Carmustina tópica				
- No (48)	8,4 (7 – 9,9)	0,4	13 (11 – 15,1)	0,4
- Sí (18)	3,8 (2,3 – 5,3)		10,7 (4,1 – 17,4)	

Pacientes con resección tumoral completa (RC) (cont.)				
Variable (n)	Mediana SLR meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)
QT 3ª línea y post. - No (58) - Sí (6)	NA	NA	12,3 (9,8 – 14,7) 23,1 (13,9 – 32,2)	0,3
p53 (-/+) (43) (++/+++) (22)	8 (6,6 – 9,3) 4,5 (<1 – 11,1)	0,9	12,9 (11,8 – 14) 12,4 (6,6 – 18,2)	0,7
EGFR (-) (22) (+/++) (44)	7,7 (3,9 – 11,4) 7,8 (5,2– 10,4)	0,6	13,1 (10,3 – 16) 12,7 (11,2 – 14,2)	0,45
pRb (-) (19) (+/++) (36)	9,7 (8,3 – 11,2) 7,7 (4,1– 11,2)	0,5	16,9 (10,8 – 23) 13,2 (10,5 – 16)	0,15
pTEN (-) (20) (+/++/C) (43)	6,3 (4,3 – 8,4) 8,9 (6,4 – 11,4)	0,8	12,8 (11,5 – 14,2) 13,2 (10,7 – 15,7)	0,5
Ki67 (-) (34) (+/++) (31)	8,9 (7,6 – 10,2) 5,2 (1,1 – 9,2)	0,4	12,3 (10,5 – 14,1) 13,3 (9,7 – 16,9)	0,7
MGMT (IHQ) (-) (36) (+) (26)	7 (4,7 – 9,4) 8,7 (6,5 – 11)	0,4	12,8 (11 – 14,7) 14,3 (10,1 – 18,4)	0,2
MGMT30 (RT-PCR) No Metilado (31) Metilado (34)	7,7 (3,7 – 11,6) 8,1 (4,4 – 11,9)	0,3	12,7 (11,6 – 13,8) 12,9 (9,1 – 16,8)	0,4

NA: No aplicable.

Pacientes con biopsia o resección tumoral parcial (Bx o RP)				
Variable (n)	Mediana SLR meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)
Sexo				
- Hombre (55)	2,7 (1,3 – 4,1)	0,9	4,6 (2,8 – 6,3)	0,9
- Mujer (48)	1,9 (<1 – 3,3)		2,7 (1,6 – 3,8)	
Edad (años)				
< 50 (16)	2,1 (<1 – 9,2)	0,4	2,8 (<1 – 10,5)	0,6
> 50 (87)	2,2 (1,5 – 2,9)		4 (2,7 – 5,2)	
< 60 (48)	2,4 (1,1 – 3,6)	0,7	4,6 (<1 – 9)	0,5
> 60 (55)	2 (<1 – 3,4)		3,6 (2,2 – 5,1)	
< 70 (72)	2,2 (1,5 – 2,9)	0,3	3,8 (1,5 – 6)	0,3
> 70 (31)	2 (<1 – 4,3)		4,3 (1,8 – 6,8)	
Tabaco (paqs-años)				
- No/Ex/<10 (70)	2,2 (1,3 – 3,1)	0,4	4 (2,3 – 5,7)	0,6
- Fuma 10-20/>20 (26)	3,5 (<1 – 6,3)		6,6 (2,8 – 10,3)	
Alcohol				
- No/Ex (82)	2,4 (1,3 – 3,5)	0,3	4,5 (2,4 – 6,5)	0,4
- Bebedor >40 (16)	2,7 (<1 – 6,8)		3,4 (2,4 – 4,3)	
Glioma previo				
- No (100)	2,2 (1,3 – 3,1)	0,1	4 (2,4 – 5,6)	0,6
- Sí (3)	2,1 (<1 – 5,5)		2,8 (1,4 – 4,2)	
Clínica Debut	Significativa			0,8
- Déficit (76)			3,3 (1,6 – 5)	
- Otros (27)			6,6 (2 – 11)	
Demora Dx (días)			Significativa	
< 90 (90)	2,1 (1,3 – 2,9)	0,06		
> 90 (13)	4,3 (2,4 – 6,2)			
Localización				
- Hemisféricos (84)	2,4 (1,1 – 3,7)	0,6	4,3 (2,7 – 6)	0,08
- Diencef / Multi (19)	<1 (----)		2,3 (1,7 – 2,9)	
Tamaño (cm)				
< 4,3 (26)	2,1 (<1 – 5,6)	0,2	3,8 (<1 – 11,8)	0,5
> 4,3 (77)	2,2 (1,4 – 3)		4 (2,6 – 5,3)	
Demora a IQ (días)				
< 19,6 (67)	2,1 (1,1 – 3)	0,4	3,4 (1,9 – 4,8)	0,5
> 19,6 (36)	2,4 (<1 – 4,2)		6,7 (2,6 – 10,8)	
Anticomiciales				
- No (38)	2 (1,6 – 2,4)	0,08	2,9 (1,6 – 4,3)	0,1
- Sí (65)	2,7 (<1 – 4,6)		5,4 (2,2 – 8,7)	

Pacientes con biopsia o resección tumoral parcial (Bx o RP) (cont.)				
Variable (n)	Mediana SLR meses (IC95%)	p valor (log Rank test)	Mediana SG meses (IC95%)	p valor (log Rank test)
Carmustina tópica - No (95) - Sí (8)	2,2 (1,2 – 3,2) 2,4 (<1 – 5,2)	0,9	4 (2,4 – 5,5) 2,8 (<1 – 15)	0,9
QT 3ª línea y post. - No (101) - Sí (2)	NA	NA	3,8 (2,3 – 5,2) 12,8 (----)	0,3
p53 (-/+) (66) (++/+++) (32)	2,4 (<1 – 4) 2,1 (1,6 – 2,5)	0,1	4,4 (1,7 – 7,2) 3,8 (2,1 – 5,4)	0,4
EGFR (-) (36) (+/++) (57)	2 (<1 – 5,9) 2,4 (1,3 – 3,5)	0,7	3,6 (1,1 – 6,2) 4,5 (2,4 – 6,6)	0,5
p16 (-/+) (61) (++/+++) (27)	2,4 (<1 – 3,8) 2,2 (<1 – 3,7)	0,2	4 (2,2 – 5,7) 4,6 (<1 – 8,9)	0,8
pRb (-) (25) (+/++) (62)	2,1 (<1 – 5,6) 2,7 (1,4 – 4)	0,9	2,8 (<1 – 6) 4,5 (2,4 – 6,6)	0,9
pTEN (-) (31) (+/++/C) (64)	2,9 (1,4 – 4,3) 2 (1,4 – 2,7)	0,8	3,2 (1,7 – 4,6) 4,3 (2,3 – 6,3)	0,5
Ki67 (-) (49) (+/++) (46)	2,4 (<1 – 3,8) 2,2 (<1 – 3,7)	0,7	3,6 (1,7 – 6,1) 4,1 (2,3 – 5,9)	0,7
CD31 < 5,4 vasos (52) > 5,4 vasos (51)	2,1 (<1 – 3,3) 2,4 (<1 – 4,3)	0,3	3,6 (1,7 – 5,5) 4 (1 – 6,9)	0,4
CD105 (endogлина) < 11,6 vasos (47) > 11,6 vasos (56)	2,1 (<1 – 3,7) 2,4 (<1 – 4,2)	0,2	3,6 (2,1 – 5,2) 4,1 (1,4 – 6,8)	0,9
MGMT (IHQ) (-) (48) (+) (43)	2 (<1 – 4,4) 2,4 (1,2 – 3,6)	0,5	3,6 (1,2 – 6,1) 4,1 (2,5 – 5,7)	0,5
MGMT30 (RT-PCR) No Metilado (38) Metilado (41)	2,7 (<1 – 5,3) 2,9 (1,2 – 4,5)	0,9	4,6 (3 – 6,2) 5,6 (2,2 – 9,1)	0,6

NA: No aplicable.

Bibliografía

-
- ¹ GLOBOCAN 2012. <http://www.globocan.iarc.fr>
 - ² Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, Schymura MJ, Ries LA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(9): 714.
 - ³ Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, et al; Brain Tumor Epidemiology Consortium. Brain Tumor Epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium (BTEC) *Cancer* 2008; 113 (supl 7): 1953-68.
 - ⁴ Brain and Other Nervous System Cancer. <http://www.seer.cancer.gov>
 - ⁵ Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* (2007) 114:97–109.
 - ⁶ Batchelor T and Louis DN. Pathology and molecular pathogenesis of diffuse gliomas. De: UptoDate en <http://www.uptodate.com> (Jul 2015)
 - ⁷ Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al: Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004, 64:6892–6899
 - ⁸ Ohgaki H, Kleihues P: Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology*, Vol. 170, No. 5, May 2007.
 - ⁹ Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker CE, Wiman KG, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: P14Arf deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* 2001, 11:159–168.
 - ¹⁰ Padfield E, Ellis HP, Kurian KM. Current Therapeutic Advances Targeting EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma. *Front. Oncol.* 2015 Jan 29;5:5.
 - ¹¹ Nazarenko I, Hede SM, He X, Hedrén A, Thompson J, et al. PDGF and PDGF receptors in glioma. *Ups J Med Sci.* 2012 May;117(2):99-112.
 - ¹² Ohgaki H1, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* 2009 Dec;100(12):2235-41.
 - ¹³ Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2007 Mar;113(3):295-302. Epub 2007 Jan 18.
 - ¹⁴ Yang P, Zhang W, Wang Y, Peng X, Chen B, et al. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: Results of a prospective registry. *Oncotarget.* 2015 Oct 12.
 - ¹⁵ Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1061-8.
 - ¹⁶ Guha A, Dashner K, Black PM, Wagner JA, Stiles CD. Expression of PDGF and PDGF receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop. *Int J Cancer.* 1995 Jan 17;60(2):168-73.
 - ¹⁷ Brat DJ, Mapstone TB. Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Ann Intern Med.* 2003 Apr 15;138(8):659-68.
 - ¹⁸ Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2001 Jun;11(3):293-9.
 - ¹⁹ Lampl Y, Eshel Y, Gilad R, Sarova-Pinchas I. Glioblastoma multiforme with bone metastase and cauda equina syndrome. *J Neurooncol.* 1990 Apr;8(2):167-72.
 - ²⁰ Chang SM, Parney IF, Huang W, Anderson FA Jr, Asher AL, Bernstein M, et al. Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. *JAMA.* 2005 Feb 2;293(5):557-64.
 - ²¹ Jaeckle KA. Neuroimaging for central nervous system tumors. *Semin Oncol.* 1991 Apr;18(2):150-7.
-

-
- ²² Jolesz FA, Schwartz RB, Gutmann CRG. Diagnostic imaging of gliomas. En: Atrocytomas: Diagnosis and treatment. Ed: Black PM, Lampson LA. Blackwell Scientific, Boston 1993.
- ²³ Zimmerman RA. Imaging of adult central nervous system primary malignant gliomas. Staging and follow-up. *Cancer*. 1991 Feb 15;67(4 Suppl):1278-83.
- ²⁴ Mabray MC, Barajas RF Jr, Cha S. Modern brain tumor imaging. *Brain Tumor Res Treat*. 2015 Apr;3(1):8-23.
- ²⁵ Sun D, Liu Q, Liu W, Hu W. Clinical application of 201Tl SPECT imaging of brain tumors. *J Nucl Med*. 2000 Jan;41(1):5-10.
- ²⁶ Thiel A, Pietrzyk U, Sturm V, Herholz K, Hovels M, Schroder R. Enhanced accuracy in differential diagnosis of radiation necrosis by positron emission tomography-magnetic resonance imaging coregistration: technical case report. *Neurosurgery*. 2000 Jan;46(1):232-4.
- ²⁷ Quigley MR, Maroon JC. The relationship between survival and the extent of the resection in patients with supratentorial malignant gliomas. *Neurosurgery*. 1991 Sep;29(3):385-8.
- ²⁸ Oppenlander ME, Wolf AB, Snyder LA, Bina R, Wilson JR, Coons SW, et al. An extent of resection threshold for recurrent glioblastoma and its risk for neurological morbidity. *J Neurosurg*. 2014 Apr;120(4):846-53.
- ²⁹ De Witt Hamer PC, Robles SG, Zwinderman AH, Duffau H, Berger MS. Impact of intraoperative stimulation brain mapping on glioma surgery outcome: a meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 10;30(20):2559-65.
- ³⁰ Long DM, Gordon T, Bowman H, Etzel A, Burleyson G, Betchen S, et al. Outcome and cost of craniotomy performed to treat tumors in regional academic referral centers. *Neurosurgery*. 2003 May;52(5):1056-63; discussion 1063-5.
- ³¹ Kickingeder P, Willeit P, Simon T, Ruge MI. Diagnostic value and safety of stereotactic biopsy for brainstem tumors: a systematic review and meta-analysis of 1480 cases. *Neurosurgery*. 2013 Jun;72(6):873-81.
- ³² De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CK, Weigelt B, Martínez-Ricarte F, Torrejon D, Oliveira M, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun*. 2015 Nov 10;6:8839. doi: 10.1038/ncomms9839.
- ³³ Bloch O, Han SJ, Cha S, Sun MZ, Aghi MK, McDermott MW, Berger MS, Parsa AT. Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: clinical article. *J Neurosurg*. 2012 Dec;117(6):1032-8.
- ³⁴ Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E Jr, Batzdorf U, Brooks WH, et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med*. 1980 Dec 4;303(23):1323-9.
- ³⁵ Andersen AP. Postoperative irradiation of glioblastomas. Results in a randomized series. *Acta Radiol Oncol Radiat Phys Biol*. 1978;17(6):475-84.
- ³⁶ Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*. 1978 Sep;49(3):333-43.
- ³⁷ Shapiro WR. Therapy of adult malignant brain tumors: what have the clinical trials taught us? *Semin Oncol*. 1986 Mar;13(1):38-45.
- ³⁸ Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol*. 2004 May 1;22(9):1583-8. Epub 2004 Mar 29.
- ³⁹ Selker RG, Shapiro WR, Burger P, Blackwood MS, Arena VC, Gilder JC, et al.; Brain Tumor Cooperative Group. The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine. *Neurosurgery*. 2002 Aug;51(2):343-55; discussion 355-7.
-

-
- ⁴⁰ Laperriere NJ, Leung PM, McKenzie S, Milosevic M, Wong S, Glen J, et al.. Randomized study of brachytherapy in the initial management of patients with malignant astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998 Jul 15;41(5):1005-11.
- ⁴¹ Laramore GE. Neutron radiotherapy for high grade gliomas: the search for the elusive therapeutic window. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990 Aug;19(2):493-5; discussion.
- ⁴² Fitzek MM, Thornton AF, Rabinov JD, Lev MH, Pardo FS, Munzenrider JE, et al. Accelerated fractionated proton/photon irradiation to 90 cobalt gray equivalent for glioblastoma multiforme: results of a phase II prospective trial. *J Neurosurg.* 1999 Aug;91(2):251-60.
- ⁴³ Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, Podgorsak EB, Werner-Wasik M, Lustig R, et al. Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Nov 1;60(3):853-60.
- ⁴⁴ Huncharek M. Meta-analytic re-evaluation of misonidazole in the treatment of high grade astrocytoma. *Anticancer Res.* 1998 May-Jun;18(3B):1935-9.
- ⁴⁵ Prados MD, Seiferheld W, Sandler HM, Buckner JC, Phillips T, Schultz C, et al. Phase III randomized study of radiotherapy plus procarbazine, lomustine, and vincristine with or without BUdR for treatment of anaplastic astrocytoma: final report of RTOG 9404. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Mar 15;58(4):1147-52.
- ⁴⁶ Prados MD, Wara WM, Sneed PK, McDermott M, Chang SM, Rabbitt J, et al. Phase III trial of accelerated hyperfractionation with or without difluoromethylornithine (DFMO) versus standard fractionated radiotherapy with or without DFMO for newly diagnosed patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001 Jan 1;49(1):71-7.
- ⁴⁷ Niyazi M, Siefert A, Schwarz SB, Ganswindt U, Kreth FW, Tonn JC, Belka C. Therapeutic options for recurrent malignant glioma. *Radiother Oncol.* 2011 Jan;98(1):1-14. doi: 10.1016/j.radonc.2010.11.006.
- ⁴⁸ Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD. Recent Advances in the Treatment of Malignant Astrocytoma. *J Clin Oncol.* 2006 Mar 10; 24(8):1253-65.
- ⁴⁹ Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro Oncol.* 2013 Jan;15(1):4-27. doi: 10.1093/neuonc/nos273.
- ⁵⁰ Green SB, Byar DP, Walker MD, Pistenmaa DA, Alexander E Jr, Batzdorf U, et al. Comparisons of carmustine, procarbazine, and high-dose methylprednisolone as additions to surgery and radiotherapy for the treatment of malignant glioma. *Cancer Treat Rep.* 1983 Feb;67(2):121-32.
- ⁵¹ Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer.* 1993 Apr 15;71(8):2585-97.
- ⁵² Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet.* 2002 Mar 23;359(9311):1011-8.
- ⁵³ Levin VA, Silver P, Hannigan J, Wara WM, Gutin PH, Davis RL, Wilson CB. Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990 Feb;18(2):321-4.
- ⁵⁴ Grossman SA, O'Neill A, Grunnet M, Mehta M, Pearlman JL, Wagner H, et al. Phase III study comparing three cycles of infusional carmustine and cisplatin followed by radiation therapy with radiation therapy and concurrent carmustine in patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma multiforme: Eastern Cooperative Oncology Group Trial 2394. *J Clin Oncol.* 2003 Apr 15;21(8):1485-91.
- ⁵⁵ Huncharek M, Muscat J, Geschwind JF. Multi-drug versus single agent chemotherapy for high grade astrocytoma; results of a meta-analysis. *Anticancer Res.* 1998 Nov-Dec;18(6B):4693-7.
- ⁵⁶ Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National
-

Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96.

⁵⁷ Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):459-66.

⁵⁸ Combs SE, Gutwein S, Schulz-Ertner D, van Kampen M, Thilmann C, Edler L, et al. Temozolomide combined with irradiation as postoperative treatment of primary glioblastoma multiforme. Phase I/II study. *Strahlenther Onkol*. 2005 Jun;181(6):372-7.

⁵⁹ Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000 Nov 9;343(19):1350-4. Erratum in: *N Engl J Med* 2000 Dec 7;343(23):1740.

⁶⁰ Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res*. 2004 Mar 15;10(6):1871-4.

⁶¹ Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997-1003.

⁶² Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncol*. 2003 Apr;5(2):79-88.

⁶³ Westphal M, Ram Z, Riddle V, Hilt D, Bortey E; Executive Committee of the Gliadel Study Group. Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006 Mar;148(3):269-75; discussion 275.

⁶⁴ Grossman SA, Alavi JB, Supko JG, Carson KA, Priet R, Dorr FA, et al. Efficacy and toxicity of the antisense oligonucleotide aprinocarsen directed against protein kinase C- α delivered as a 21-day continuous intravenous infusion in patients with recurrent high-grade astrocytomas. *Neuro-oncol*. 2005 Jan;7(1):32-40.

⁶⁵ Andrews DW, Resnicoff M, Flanders AE, Kenyon L, Curtis M, Merli G, et al. Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas. *J Clin Oncol*. 2001 Apr 15;19(8):2189-200.

⁶⁶ Moasser MM, Sepp-Lorenzino L, Kohl NE, Oliff A, Balog A, Su DS, et al. Farnesyl transferase inhibitors cause enhanced mitotic sensitivity to taxol and epothilones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 17;95(4):1369-74.

⁶⁷ Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, Eberhard DA, Jelluma N, Arvold ND, et al. Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jun 15;97(12):880-7.

⁶⁸ Reardon DA, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Desjardins A, et al. Phase 1 trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):860-8.

⁶⁹ Reardon DA, Egorin MJ, Quinn JA, Rich JN, Gururangan S, Vredenburgh JJ, et al. Phase II study of imatinib mesylate plus hydroxyurea in adults with recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 20;23(36):9359-68.

⁷⁰ Fine HA, Kim L, Royce C, et al. Results from a phase II trial of Enzastaurin (LY317615) in patients with recurrent high grade gliomas. *J Clin Oncol* 2005; 23:115S.

⁷¹ Phuphanich S, Levin VA, Yung W, et al. A multicenter randomized double blind placebo-controlled trial of Marimastat in patients with glioblastoma multiforme or gliosarcoma following completion of conventional treatment. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20:52a

-
- ⁷² Fine HA, Figg WD, Jaeckle K, Wen PY, Kyritsis AP, Loeffler JS, et al. Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol*. 2000 Feb;18(4):708-15.
- ⁷³ Grossman SA, Phuphanich S, Lesser G, Rozental J, Grochow LB, Fisher J, et al. Toxicity, efficacy, and pharmacology of suramin in adults with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol*. 2001 Jul 1;19(13):3260-6.
- ⁷⁴ Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2009 Oct 1;27(28):4733-40.
- ⁷⁵ Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014 Feb 20;370(8):709-22.
- ⁷⁶ Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014 Feb 20;370(8):699-708.
- ⁷⁷ Buckner JC, Schomberg PJ, McGinnis WL, Cascino TL, Scheithauer BW, O'Fallon JR, et al. A phase III study of radiation therapy plus carmustine with or without recombinant interferon-alpha in the treatment of patients with newly diagnosed high-grade glioma. *Cancer*. 2001 Jul 15;92(2):420-33.
- ⁷⁸ Hayes RL, Koslow M, Hiesiger EM, Hymes KB, Hochster HS, Moore EJ, et al. Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma. *Cancer*. 1995 Sep 1;76(5):840-52.
- ⁷⁹ Yamanaka R, Homma J, Yajima N, Tsuchiya N, Sano M, Kobayashi T, et al. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clin Cancer Res*. 2005 Jun 1;11(11):4160-7.
- ⁸⁰ Rutkowski S, De Vleeschouwer S, Kaempgen E, Wolff JE, Kuhl J, Demaerel P, et al. Surgery and adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for patients with relapsed malignant glioma, a feasibility study. *Br J Cancer*. 2004 Nov 1;91(9):1656-62.
- ⁸¹ Steiner HH, Bonsanto MM, Beckhove P, Brysch M, Geletneky K, Ahmadi R, et al. Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefit. *J Clin Oncol*. 2004 Nov 1;22(21):4272-81.
- ⁸² Wilcox ME, Yang W, Senger D, Rewcastle NB, Morris DG, Brasher PM, et al. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Jun 20;93(12):903-12.
- ⁸³ Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE 2nd, et al. Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase II study results. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 1;24(1):115-22.
- ⁸⁴ Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer*. 2012 Sep;48(14):2192-202. doi: 10.1016/j.ejca.2012.04.011.
- ⁸⁵ Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, et al. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015 Dec 15;314(23):2535-43. doi: 10.1001/jama.2015.16669.
- ⁸⁶ <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm465744.htm>
- ⁸⁷ Smoll NR, Schaller K, Gautschi OP. Long-term survival of patients with glioblastoma multiforme (GBM). *J Clin Neurosci*. 2013 May;20(5):670-5.
- ⁸⁸ Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Oct;23(10):1985-96.
- ⁸⁹ Scott CB, Scarantino C, Urtasun R, Movsas B, Jones CU, Simpson JR, et al. Validation and
-

predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998 Jan 1;40(1):51-5.

⁹⁰ Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 1;24(16):2563-9.

⁹¹ Backlund LM, Nilsson BR, Goike HM, Schmidt EE, Liu L, Ichimura K, Collins VP. Short postoperative survival for glioblastoma patients with a dysfunctional Rb1 pathway in combination with no wild-type PTEN. *Clin Cancer Res.* 2003 Sep 15;9(11):4151-8.

⁹² Burton EC, Lamborn KR, Forsyth P, Scott J, O'Campo J, Uyehara-Lock J, et al. Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors. *Clin Cancer Res.* 2002 Jan;8(1):180-7.

⁹³ Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham LD, Dorfman MV, Piscatelli N, et al. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):228-33.

⁹⁴ Cofiño, A. S., Gutiérrez, J. M., Jakubiak, B., y Melonek, M. (2003). Implementation of data mining techniques for meteorological applications. En W. Zwielfhofer and N. Kreitz, eds., *Proceedings of the Tenth ECMWF Workshop on the Use of High Performance Computing in Meteorology: Realizing TeraComputing*, pp. 256–271. World Scientific Publishing.

⁹⁵ Agrawal, R., Imielinski, T., and Swami, A. (1993). Mining association rules between sets of items in large databases. In P. Buneman and S. Jajodia, eds., *Proceedings of the International Conference on Management of Data*, vol. 22(2), pp. 207–216. ACM Press.

⁹⁶ Gutierrez JM, Cano R, Cofiño AS and Sordo CM. "Redes probabilísticas y neuronales en las ciencias atmosféricas". *Monografías del instituto nacional de meteorología*. Ministerio de medio ambiente. Madrid (2004) ISBN: 84-8320-281-6.

⁹⁷ Castillo, E., Gutiérrez, J. M., and Hadi, A. S. (1997). *Expert Systems and Probabilistic Network Models*. Springer-Verlag. Free Spanish version <http://personales.unican.es/gutierjm>.

⁹⁸ Pearl J. *Causality: Models, Reasoning, and Inference*. Cambridge University Press. (2000) ISBN 0-521-77362-8.

⁹⁹ <https://jpordonez.wordpress.com/2008/08/08/redes-bayesianas/>

¹⁰⁰ Gevaert O, De Smet F, Timmerman D, Moreau Y, De Moor B. Predicting the prognosis of breast cancer by integrating clinical and microarray data with Bayesian networks. *Bioinformatics.* 2006 Jul 15;22(14):e184-90.

¹⁰¹ Ni Y, Stingo FC, Baladandayuthapani V. Integrative bayesian network analysis of genomic data. *Cancer Inform.* 2014 Sep 21;13(Suppl 2):39-48.

¹⁰² Wang W, Baladandayuthapani V, Holmes CC, Do KA. Integrative network-based Bayesian analysis of diverse genomics data. *BMC Bioinformatics.* 2013;14 Suppl 13:S8. doi: 10.1186/1471-2105-14-S13-S8. Epub 2013 Oct 1.

¹⁰³ Jin D, Lee H. A computational approach to identifying gene-microRNA modules in cancer. *PLoS Comput Biol.* 2015 Jan 22;11(1):e1004042.

¹⁰⁴ Conill C, Verger E, Salameo M. Performance status assessment in cancer patients. *Cancer.* 1990 Apr 15;65(8):1864–1866.

¹⁰⁵ <http://www.archbronconeumol.org/es/guia-clinica-el-diagnostico-el/articulo/13014298/>

¹⁰⁶ <http://www.msssi.gob.es/campanas/campanas07/alcoholmenores9.htm>

¹⁰⁷ Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0. http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm

¹⁰⁸ Surget S, Khoury MP, Bourdon JC. "Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective". *OncoTargets and Therapy* 7: 57–68

-
- ¹⁰⁹ Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI. "ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies". *J. Clin. Invest.* 117 (8): 2051–8.
- ¹¹⁰ Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. "Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis". *Nature* 436 (7051): 725–30.
- ¹¹¹ Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. "Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers". *Nature* 368 (6473): 753–6.
- ¹¹² Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science*. 1984 Mar 9;223(4640):1028-33.
- ¹¹³ Scholzen T, Gerdes J. "The Ki-67 protein: from the known and the unknown". *J. Cell. Physiol.* 182 (3): 311–22.
- ¹¹⁴ Tang DG, Chen YQ, Newman PJ, Shi L, Gao X, Diglio CA, Honn KV. "Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium". *J. Biol. Chem.* 268 (30): 22883–94.
- ¹¹⁵ Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S (Jun 2003). "CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications". *FASEB Journal* 17 (9): 984–92.
- ¹¹⁶ Shiraishi A, Sakumi K, Sekiguchi M. "Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase". *Carcinogenesis* 21 (10): 1879–83.
- ¹¹⁷ <http://www.zymoresearch.com/epigenetics/dna-methylation/region-specific-dnamethylation-analysis/onestep-qmethyl-kit>
- ¹¹⁸ http://www. Roche.com/about/business/diagnostics/products_and_solutions.htm
- ¹¹⁹ Rood BR, Zhang H, Cogen PH, y cols. Intercellular heterogeneity of expression of the MGMT DNA repair gene in pediatric medulloblastoma. *Neuro-Oncology* 2004; 6:200-207.
- ¹²⁰ Shaw RJ, Hall GL, Iowe D, y cols. The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: correlation of quantitative methylation data with gene expression. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 2008 Mar;134(3):251-6.
- ¹²¹ Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53; 457-481.
- ¹²² Peto R, Pike MC. Conservation of the approximation $(O-E)^2/E$ in logrank-test survival data on tumour incidence data. *Biometrika* 1977; 29: 579-584.
- ¹²³ Chen, P. Y., & Popovich, P. M. (2002). *Correlation: Parametric and nonparametric measures*. Thousand Oaks, CA: Sage Publications.
- ¹²⁴ Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc.* 1972; 34: 187-220.
- ¹²⁵ http://nosetup.org/php_on_line/numero_aleatorio_2
- ¹²⁶ Fawcett T. ROC Graphs: Notes and Practical Considerations for Researchers. HP Laboratories, MS 1143, 1501 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304. http://web.archive.org/web/http://home.comcast.net/~tom.fawcett/public_html/papers/ROC101.pdf
- ¹²⁷ Johnson DR, Ma DJ, Buckner JC, Hammack JE. Conditional probability of long-term survival in glioblastoma: a population-based analysis. *Cancer*. 2012 Nov 15;118(22):5608-13.
- ¹²⁸ Michaelsen SR, Christensen IJ, Grunnet K, Stockhausen MT, Broholm H, Kosteljanetz M, Poulsen HS. Clinical variables serve as prognostic factors in a model for survival from glioblastoma multiforme: an observational study of a cohort of consecutive non-selected patients from a single institution. *BMC Cancer*. 2013 Sep 3;13:402.
- ¹²⁹ Graus F, Bruna J, Pardo J, Escudero D, Vilas D, Barceló I, et al. Patterns of care and outcome for patients with glioblastoma diagnosed during 2008-2010 in Spain. *Neuro Oncol*. 2013 Jun;15(6):797-805. doi: 10.1093/neuonc/not013. Epub 2013 Mar 3.
-

-
- ¹³⁰ Blumenthal DT, Won M, Mehta MP, et al. Short delay in initiation of radiotherapy may not affect outcome of patients with glioblastoma: a secondary analysis from the radiation therapy oncology group database. *J Clin Oncol*. 2009;27:733 – 739.
- ¹³¹ Noel G, Huchet A, Feuvret L, et al. Waiting times before initiation of radiotherapy might not affect outcomes for patients with glioblastoma: a French retrospective analysis of patients treated in the era of concomitant temozolomide and radiotherapy. *J Neurooncol*. 2012;109:167 – 175.
- ¹³² Irwin C, Hunn M, Purdie G, Hamilton D. Delay in radiotherapy shortens survival in patients with high grade glioma. *J Neurooncol*. 2007;85:339–343.
- ¹³³ Shastry AH, Thota B, Arimappamagan A, Santosh V. P53 stratification reveals the prognostic utility of matrix metalloproteinase-9 protein expression in glioblastoma. *Neurol India*. 2015 May-Jun;63(3):399-404.
- ¹³⁴ van Diest PJ, van der Wall E, Baak JP. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol*. 2004 Jul;57(7):675-81.
- ¹³⁵ Parham DM. Immunohistochemical Markers of Soft Tissue Tumors: Pathologic Diagnosis, Genetic Contributions, and Therapeutic Options. *Anal Chem Insights*. 2015 Oct 29;10(Suppl 1):1-10.
- ¹³⁶ Vilar E, Salazar R, Pérez-García J, Cortes J, Oberg K, Tabernero J. Chemotherapy and role of the proliferation marker Ki-67 in digestive neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Jun;14(2):221-32.
- ¹³⁷ Johannessen AL, Torp SH. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res*. 2006;12(3):143-7. Epub 2006 Sep 23.
- ¹³⁸ Behrem S, Zarkovic K, Eskinja N, Jonjic N. Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat Med J*. 2005 Jun;46(3):417-22.
- ¹³⁹ Afshar Moghaddam N, Mahsuni P, Taheri D. Evaluation of Endoglin as an Angiogenesis Marker in Glioblastoma. *Iran J Pathol*. 2015 Spring;10(2):89-96.
- ¹⁴⁰ Schaal C, Chellappan SP. Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Mol Cancer Res*. 2014 Jan; 12(1):14-23. Epub 2014 Jan 7.
- ¹⁴¹ González Astorga B. “Metilación del promotor de la enzima MGMT (O6–metilguanina-DNA metiltransferasa) y expresión de MGMT y CD133 como marcadores pronósticos en pacientes con glioblastoma multiforme tratados con temozolamida y radioterapia” [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada. Facultad de Medicina; 2012.
- ¹⁴² Bobustuc GC, Baker CH, Limaye A, Jenkins WD, Pearl G, Avgeropoulos NG, et al. Levetiracetam enhances p53-mediated MGMT inhibition and sensitizes glioblastoma cells to temozolomide. *Neuro Oncol*. 2010 Sep;12(9):917-27.
- ¹⁴³ Kim YH, Kim T, Joo JD, Han JH, Kim YJ, Kim IA, et al. Survival benefit of levetiracetam in patients treated with concomitant chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with temozolomide for glioblastoma multiforme. *Cancer*. 2015 Sep 1;121(17):2926-32.
- ¹⁴⁴ Ryu CH, Yoon WS, Park KY, Kim SM, Lim JY, Woo JS, et al. Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:987495.
- ¹⁴⁵ Hosein AN, Lim YC, Day B, Stringer B, Rose S, Head R, et al. The effect of valproic acid in combination with irradiation and temozolomide on primary human glioblastoma cells. *J Neurooncol*. 2015 Apr;122(2):263-71.
- ¹⁴⁶ Altundag O, Altundag K, Boruban C, Altundag MB, Turen S. Phenytoin may increase the efficacy of temozolomide by methylating DNA-repair enzyme, O6-methylguanine-DNA methyltransferase in patients with glioblastoma. *Med Hypotheses*. 2005;65(4):819-20.
- ¹⁴⁷ Tortosa A, Viñolas N, Villà S, Verger E, Gil JM, Brell M, et al. Prognostic implication of clinical, radiologic, and pathologic features in patients with anaplastic gliomas. *Cancer*. 2003 Feb 15;97(4):1063-71.
-

-
- ¹⁴⁸ Kirla R, E. Salminen, S. Huhtala, J. Nuutinen, L. Talve, H. Haapasalo & H. Kalim: Prognostic value of the expression of tumor suppressor genes p53, p21, p16 and prb, and Ki-67 labelling in high grade astrocytomas treated with radiotherapy. *J Neurooncol* 2000; 46, 71-80.
- ¹⁴⁹ Sica G, Lama G, Anile C, Geloso MC, La Torre G, De Bonis P, Maira G, Lauriola L, Jhanwar-Uniyal M, Mangiola A. Assessment of angiogenesis by CD105 and nestin expression in peritumor tissue of glioblastoma. *Int J Oncol*. 2011 Jan;38(1):41-9.
- ¹⁵⁰ Yao Y, Kubota T, Takeuchi H, Sato K. Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology*. 2005 Sep;25(3):201-6.
- ¹⁵¹ Brown JM. Vasculogenesis: a crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy. *Br J Radiol*. 2014 Mar;87(1035):20130686.
- ¹⁵² Ushio Y, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Shinojima N, Kochi M, Saya H. Correlation of molecular genetic analysis of p53, MDM2, p16, PTEN, and EGFR and survival of patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma. *Front Biosci*. 2003 May 1;8:e281-8.
- ¹⁵³ Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999, 59:793e797.
- ¹⁵⁴ Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, Wager M, Fromant G, Saikali S, et al. Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol* 2010, 97:311e322.
- ¹⁵⁵ Chen C, Wang F, Cheng Y, Cheng Y, Ren X, Huai H. Predictive value of MGMT promoter methylation status in Asian and Caucasian patients with malignant gliomas: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Apr 15;8(4):6553-62. eCollection 2015.
- ¹⁵⁶ Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, et al: Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol* 9:29–38, 2008.
- ¹⁵⁷ Kalkan R, Atli Eİ, Özdemir M, Çiftçi E, Aydın HE, Artan S, Arslantaş A. IDH1 mutations is prognostic marker for primary glioblastoma multiforme but MGMT hypermethylation is not prognostic for primary glioblastoma multiforme. *Gene*. 2015 Jan 1;554(1):81-6.
- ¹⁵⁸ Yin AA, Zhang LH, Cheng JX, Dong Y, Liu BL, Han N, Zhang X. The predictive but not prognostic value of MGMT promoter methylation status in elderly glioblastoma patients: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Jan 13;9(1):e85102.
- ¹⁵⁹ Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, y cols. 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.
- ¹⁶⁰ Wager M, Menei P, Guilhot J, y cols. Prognostic molecular markers with no impact on decision-making: the paradox of gliomas based on a prospective study. *Br J Cancer* 2008; 98(11):1830-1838.
- ¹⁶¹ Tang K, Jin Q, Yan W, y cols, Clinical correlation of MGMT protein expression and promoter methylation in Chinese glioblastoma patients. *Med Oncol* 2011, Mar 11.
-