



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2022

**ASPECTOS CLÍNICOS Y MOLECULARES DE LA
REINTERVENCIÓN EN PACIENTES AFECTOS DE
GLIOBLASTOMA**

Víctor González Jiménez



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2022

Programa de Doctorado en Neurociencias

**ASPECTOS CLÍNICOS Y MOLECULARES DE LA
REINTERVENCIÓN EN PACIENTES AFECTOS DE
GLIOBLASTOMA**

Víctor González Jiménez

Directora: Marta Brell Doval

Tutora: Cristina Nicolau Llobera

Doctor por la Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears

DRA MARTA BRELL DOVAL, PROFESORA ASOCIADA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS Y JEFA DE SECCIÓN DEL SERVICIO DE NEUROCIRUGÍA DEL HOSPITAL SON ESPASES

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Aspectos clínicos y moleculares de la reintervención en pacientes afectos de glioblastoma*, presentada por Víctor González Jiménez para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

rell (

Palma de Mallorca, 17 de agosto de 2022.



G CONSELLERIA
O SALUT I CONSUM
I DIRECCIÓ GENERAL
B RECERCA SALUT,
FORMACIÓ
I ACREDITACIÓ



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS ISLAS BALEARES

Gema Jiménez Jiménez, Secretaria Técnica del Comité de Ética de la Investigación de las Islas Baleares,

CERTIFICO:

Que este Comité, en la sesión celebrada el día 25 de mayo (nº 06/2022), evaluó los aspectos metodológicos, éticos y legales del proyecto de investigación:

Código CEI: IB 4893/22 PI

Título: ASPECTOS CLÍNICOS Y MOLECULARES DE LA REINTERVENCIÓN EN PACIENTES AFECTOS DE GLIOMAS DE ALTO GRADO

Promotor: Hospital Universitario Son Espases

Que en dicha sesión se acordó solicitar aclaraciones al promotor.

Que en la sesión del día 29 de junio (nº 07/2022) se evaluó de nuevo el estudio, considerando válidas las aclaraciones presentadas.

Que se acuerda emitir DICTAMEN FAVORABLE para la realización de este proyecto de investigación en los siguientes centros:

Investigador principal	Centro	Servicio
Víctor González Jiménez	Hospital Universitario Son Espases	Neurocirugía

Que el CEI-IB, tanto en su composición como en los PNT, cumple con las normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/E6 R2) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen.

Que, a la fecha de aprobación de este estudio, la composición del CEI-IB es la siguiente:

Presidente:	Francisco Campoamor Landín	Farmacología clínica
Vice-presidenta:	Cristina Villena Portella	Biología
Secretaria:	Gema Jiménez Jiménez	Biología
Vocales:	Miguel Ángel Benito Tovar	Delegado de protección de datos
	Enrique Colás Ruiz	Cirugía general y del aparato digestivo
	Magdalena Esteva Cantó	Medicina preventiva y salud pública

C. del calçat, 2 A, 2n
07011 Palma
Tel. 971 17 73 78
ceic_ib@caib.es
ceisalut.caib.es

<https://vd.caib.es/1658400653659-466544388-8731491078127046921>



Adreça de validació:

<https://csv.caib.es/hash/1658400653659-466544388-8731491078127046921>

CSV: 1658400653659-466544388-8731491078127046921

Pàgina 1/3



GOIB

Francisco Javier Fanjul Losa
Miquel Fiol Sala
Rocio Gómez Juanes
Gemma Jiménez Guerra
Raquel Marsé Fabregat
Antònia Mas Cantalops
Cristina Moreno Mulet
Antònia Obrador Hevia
Jaume Orfila Timoner
Carmen Pata Iglesias
José Ignacio Ramírez Manent
Pere Riutord Sbert
Montserrat Rodríguez Delgado
Juan Rodríguez García
Mónica Sanz Muñoz
Llorenç Socías Crespi
Javier Ureña Morales

Medicina interna
Medicina intensiva
Psiquiatria
Microbiología
Oncología médica
Derecho
Enfermería
Biología
Medicina interna
Farmacia atención primaria
Medicina familiar y comunitaria
Estomatología
Química
Medicina preventiva y salud pública
Farmacia hospitalaria
Medicina intensiva
Derecho

Palma, en fecha de la firma digital

C. del calçat, 2 A, 2n
07011 Palma
Tel. 971 17 73 78
ceic_ib@caib.es
ceisalut.caib.es

<https://vd.caib.es/1658400653659-466544388-8731491078127046921>



2

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis, Marta Brell, la dedicación, paciencia y apoyo que ha brindado a este trabajo. Sus palabras, apuntes, ideas y correcciones me han permitido llegar más fácilmente a esta meta.

Por otro lado, agradecer a mis padres Feliciano y Montse, a mi hermano Dani, y a Dan; su paciencia, comprensión y apoyo incondicional durante todos los días y horas que he dedicado a esta *actividad extraescolar*.

Asimismo, gracias a mis compañeros del servicio de Neurocirugía del Hospital Son Espases, ya amigos y cómplices, por su respaldo durante el proceso.

Por último, y no menos importante, gracias a Antía por sus revisiones de inglés en cada uno de los artículos y a Elena y Karina por su soporte en las artes gráficas.

PRESENTACIÓN

La presente tesis doctoral perteneciente al programa de Doctorado en Neurociencias por la Universitat de les Illes Balears obedece al formato de compendio de publicaciones científicas. Los dos artículos de investigación que constituyen el núcleo de la tesis han obtenido su aceptación definitiva en revistas internacionales indexadas en el *Journal of Citation Reports* (JCR), estando pendientes de publicación. Las referencias de dichos artículos son:

Analyzing the role of reoperation in recurrent glioblastoma: A 15-year retrospective study in a single institution. Autores: Víctor González Jiménez, Marta Brell Doval, José Fuster Salvá, Lesmes Moratinos Ferrero, Daniel Alegre Ruano, Sofía López Lage, Javier Ibáñez Domínguez. Aceptado para publicación definitiva en la revista ***World Journal of Surgical Oncology*** (DOI: 10.1186/s12957-022-02852-3) el 28 de agosto de 2022.

Quantitative analysis of MGMT promoter methylation status changes by pyrosequencing in recurrent glioblastoma. Autores: Víctor González Jiménez, Marta Brell Doval, Cristina Gómez Bellvert, Víctor Goliney Goliney, Osman Salazar Asencio, Adriana Gómez Martín, Javier Ibáñez Domínguez. Aceptado para publicación definitiva en la revista ***Neuropathology*** (DOI:10.1111/neup.12887) el 13 de noviembre de 2022.

El primer y el segundo artículo, disponibles al final del texto en el apartado de Anexos, versan respectivamente sobre aspectos clínicos y de biología molecular en pacientes reintervenidos de glioblastoma. Por ello, se ha redactado una Introducción general separada en los apartados A y B sobre el estado actual de las cuestiones a estudio. Posteriormente, se han elaborado los Capítulos I y II que tienen como núcleo los artículos anteriormente citados. Cada capítulo consta de los siguientes apartados:

- Justificación
- Hipótesis y Objetivos
- Material y métodos
- Resultados
- Discusión
- Conclusiones

Además, el Capítulo I desarrolla también los hallazgos clínicos y los resultados estadísticos de la reintervención en pacientes afectados de gliomas grado III de la clasificación de la OMS, que, junto con el glioblastoma, han constituido durante décadas la entidad patológica denominada “gliomas de alto grado”.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-ALA: Ácido 5-aminolevulínico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

BHE: Barrera hematoencefálica

BSC: Tratamiento sintomático (*Best supportive care*)

BVZ: Bevacizumab

CBTRUS: *Central Brain Tumor Registry of the United States*

CpGs: Nucleótidos de citosina y guanina enlazados por grupos fosfato

EANO: *European Association for Neuro-Oncology*

ECOG: Puntuación en la escala *Eastern Cooperative Oncology Group*

EGFR: *Endothelial Growth Factor Receptor*

FDA: *Food and Drug Administration*

FISH: *Fluorescent in-situ hybridization*

FLAIR: *Fluid Attenuation Inversion Recovery*

GGBB: Ganglios basales

GTR: Resección total (*Gross total resection*)

Gy: Gray

HR: Razón de riesgos (*Hazard ratio*)

IC95%: Intervalo de confianza al 95%

IDH: Isocitrato deshidrogenasa

KPS: Puntuación en la escala *Karnofsky Performance Scale*

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LITT: Terapia térmica intersticial con laser

MGMT: O⁶-metilguanina-AND-metiltransferasa

MRS: Espectroscopía por resonancia magnética

MS-HRM: *Methylation Specific High-Resolution Melting*

MS-MLPA: *Methylation-Specific Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*

MSP: Polimerasa específica de Metilación (*Methylation-Specific Polymerase*)

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*

O⁶-mG: O⁶-metilguanina

OMS: Organización Mundial de la Salud

OS: Supervivencia global (*Overall Survival*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)

PET: Tomografía de emisión de positrones

PFS: Intervalo libre de progresión (*Progression-free survival*)

PPS: Supervivencia tras la progresión (*Post-progression survival*)

RANO: *Response Assessment in Neuro-Oncology*

RM: Resonancia magnética

RMi: Resonancia magnética intraoperatoria

SNC: Sistema nervioso central

SNO: *Society for Neuro-Oncology*

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

STR: Resección incompleta (*Subtotal resection*)

TC: Tomografía computarizada

TMZ: Temozolamida

TTFs: *Tumor Treating Fields*

ÍNDICE

RESUMEN	23
----------------------	-----------

INTRODUCCIÓN	33
---------------------------	-----------

A. ASPECTOS CLINICOS GENERALES DE LAS RECIDIVAS DE GLIOMAS DE ALTO GRADO35

<i>A.1. CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO</i>	<i>36</i>
<i>A.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO</i>	<i>42</i>
<i>A.3. PRESENTACIÓN CLÍNICA, DIAGNÓSTICO Y MANEJO INICIAL DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO</i>	<i>45</i>
<i>A.3.1. Presentación clínica</i>	<i>45</i>
<i>A.3.2. Neuroimagen</i>	<i>45</i>
<i>A.3.3. Opciones de tratamiento quirúrgico.....</i>	<i>49</i>
<i>A.3.4. Técnicas de imagen intraoperatoria</i>	<i>50</i>
<i>A.4. TRATAMIENTO COMPLEMENTARIO DE GLIOMAS DE ALTO GRADO....</i>	<i>53</i>
<i>A.4.1. Radioterapia.....</i>	<i>53</i>
<i>A.4.2. Tratamiento sistémico.....</i>	<i>55</i>
<i>A.4.3. Tumor Treating Fields</i>	<i>59</i>
<i>A.4.4. Algoritmos de manejo.....</i>	<i>60</i>
<i>A.5. ASPECTOS PRONÓSTICOS DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO.....</i>	<i>63</i>
<i>A.5.1 Estudios poblacionales.....</i>	<i>63</i>
<i>A.5.2. Factores clínicos.....</i>	<i>63</i>
<i>A.5.3. Factores moleculares.....</i>	<i>64</i>
<i>A.5.4. Modelos pronósticos.....</i>	<i>69</i>
<i>A.6. MANEJO DE LAS RECIDIVAS DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO.....</i>	<i>71</i>
<i>A.6.1. Progresión de la enfermedad y diagnósticos diferenciales</i>	<i>71</i>
<i>A.6.2. Generalidades sobre el tratamiento de las recidivas</i>	<i>74</i>
<i>A.6.3. Reintervención.....</i>	<i>75</i>
<i>A.6.4. Reirradiación.....</i>	<i>76</i>
<i>A.6.5. Quimioterapia.....</i>	<i>78</i>
<i>A.6.6. Terapias dirigidas al genotipo.....</i>	<i>80</i>
<i>A.6.7. Tumor Treating Fields</i>	<i>81</i>
<i>A.6.8. Inmunoterapia</i>	<i>82</i>

<i>A.6.9. Terapia térmica intersticial con láser</i>	<i>84</i>
<i>A.6.10. Tratamiento sintomático.....</i>	<i>84</i>
<i>A.6.11. Algoritmos terapéuticos.....</i>	<i>85</i>

B. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS MOLECULARES EN RELACIÓN CON EL GEN *MGMT* EN PACIENTES REINTERVENIDOS DE GLIOMAS DE ALTO GRADO.....89

<i>B.1. PRINCIPIOS DE LA EPIGENÉTICA</i>	<i>90</i>
<i>B.1.1. Definición de epigenética.....</i>	<i>90</i>
<i>B.1.2. Regulación epigenética</i>	<i>91</i>
<i>B.1.3. Marcas epigenéticas.....</i>	<i>92</i>
<i>B.1.4. Procesos regulados por cambios epigenéticos.....</i>	<i>94</i>
<i>B.1.5. La epigenética en oncología.....</i>	<i>96</i>
<i>B.2. EL GEN <i>MGMT</i>, EL ENZIMA <i>MGMT</i> Y SU MECANISMO DE ACCIÓN.</i>	<i>99</i>
<i>B.2.1. Mecanismos de reparación del ADN.....</i>	<i>99</i>
<i>B.2.2. La molécula <i>MGMT</i>: mecanismo de acción y expresión fisiológica.....</i>	<i>101</i>
<i>B.2.3. <i>MGMT</i> y tumorigénesis</i>	<i>102</i>
<i>B.2.4. <i>MGMT</i> y agentes alquilantes.....</i>	<i>103</i>
<i>B.2.5. El gen <i>MGMT</i>.....</i>	<i>105</i>
<i>B.3. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DEL ESTADO <i>MGMT</i> EN MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL.....</i>	<i>108</i>
<i>B.4. TÉCNICAS DE ESTUDIO DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN <i>MGMT</i>.....</i>	<i>111</i>
<i>B.4.1. Pretratamiento de las muestras del ADN genómico.....</i>	<i>111</i>
<i>B.4.2. Técnicas específicas para el estudio de metilación.....</i>	<i>113</i>
<i>B.5. CAMBIOS EN EL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR <i>MGMT</i> ESTUDIADOS EN LA REINTERVENCIÓN DE GLIOMAS DE ALTO GRADO..</i>	<i>118</i>
<i>B.5.1. Primeras observaciones</i>	<i>118</i>
<i>B.5.2. Literatura específica sobre cambios de metilación.....</i>	<i>119</i>
<i>B.5.3. Mecanismos implicados en los cambios encontrados.....</i>	<i>121</i>

Capítulo I: DETERMINACIÓN DEL IMPACTO PRONÓSTICO DE LA REINTERVENCIÓN EN PACIENTES AFECTOS DE GLIOMAS DE ALTO GRADO.....125

1. JUSTIFICACIÓN.....	127
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	129
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	131
3.1. Selección de pacientes	131
3.2. Variables a estudio.....	132
3.3. Variables de resultado (outcomes).....	155
3.4. Análisis estadístico.....	156
4. RESULTADOS	161
4.1. Descripción general de la serie	161
4.2. Estadística descriptiva sobre los gliomas grado IV de la OMS.....	163
4.3. Análisis de supervivencia comparativo entre resecciones y biopsias en gliomas de grado IV de la OMS.....	179
4.4. Análisis estadístico del impacto pronóstico de la reintervención en gliomas grado IV de la OMS.....	183
4.5. Estadística descriptiva sobre los gliomas grado III de la OMS.....	206
4.6. Análisis de supervivencia comparativo entre resecciones y biopsias en gliomas de grado III de la OMS	216
4.7. Análisis estadístico del impacto pronóstico de la reintervención en gliomas grado III de la OMS.....	218
5. DISCUSIÓN.....	222
5.1. Resultados generales de la serie.....	222
5.2. Biopsia frente a resección	223
5.3. Factores pronósticos en gliomas de alto grado y sus recidivas.....	224
5.4. Modelos pronósticos de supervivencia	231
5.5. Revisiones sistemáticas y meta-análisis sobre reintervención en gliomas de alto grado.....	232
5.6. Diversas publicaciones con metodología de regresión clásica no encuentran en la reintervención un beneficio en la supervivencia.....	238
5.7. Indicaciones quirúrgicas de la reintervención	240
5.8. El rol de la reintervención como tratamiento único	242
5.9. Asumir una ventaja pronóstica en el grupo de reintervenidos analizando únicamente los datos de supervivencia global: posible sobreestimación.....	243
5.10. La importancia del intervalo libre de progresión.....	244
5.11. Grado de resección como variable pronóstica	246

5.12.La importancia del análisis multivariante para la búsqueda de variables subrogadas	248
5.13. Discusión de las complicaciones	249
5.14. Comparación de los grupos de interés	251
5.15. El sesgo de selección y el sesgo temporal	253
5.16. ¿Debemos contraindicar las reintervenciones por suponer un factor de riesgo?.....	258
5.17. Resección supramáxima.....	259
5.18. La reintervención en pacientes de edad avanzada	260
5.19. Análisis específico en gliomas grado III.....	261
5.20. Limitaciones.....	263
6. CONCLUSIONES.....	267

Capítulo II: ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *MGMT* MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN EN RECIDIVA DE GLIOBLASTOMA 269

1. JUSTIFICACIÓN.....	271
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	273
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	274
3.1. Selección de pacientes y variables a estudio.	274
3.2. Análisis del grado de metilación del promotor del gen <i>MGMT</i> mediante pirosecuenciación.	276
3.3. Análisis estadístico.....	285
4. RESULTADOS	286
4.1. Criterios de inclusión y exclusión.....	286
4.2. Descripción general del subgrupo.....	286
4.3. Resultados de la determinación del grado de metilación del promotor <i>MGMT</i> mediante pirosecuenciación	287
4.4. Resultados del análisis de muestras pareadas.....	288
4.5. Análisis de supervivencia con respecto al grado de metilación del promotor de <i>MGMT</i>	289
4.6. Análisis de correlación entre el porcentaje del grado de metilación y las variables de supervivencia.....	293
5. DISCUSIÓN.....	296
5.1. La metilación del promotor del gen <i>MGMT</i> : ¿único mecanismo de represión transcripcional?.....	296
5.2. Mecanismos de regulación adicionales de la expresión de <i>MGMT</i>	299

5.3. <i>Análisis de los cambios del grado de metilación del promotor del gen MGMT en pacientes reintervenidos de glioblastoma</i>	303
5.4. <i>Grado de metilación, supervivencia y sensibilidad a alquilantes</i>	305
5.5. <i>Aspectos metodológicos referentes a los métodos de detección</i>	307
5.6. <i>Aspectos metodológicos referentes a la calidad de las muestras a estudio</i>	312
5.7. <i>Heterogeneidad intratumoral</i>	313
5.8. <i>Selección clonal por agentes alquilantes</i>	317
5.9. <i>Limitaciones</i>	321
6. <i>CONCLUSIONES</i>	323

BIBLIOGRAFÍA	325
---------------------------	------------

ANEXOS	377
---------------------	------------

RESUMEN

Antecedentes: Los gliomas de alto grado siguen siendo una patología asociada a mal pronóstico vital de forma general, aunque con diferencias marcadas por sus atributos moleculares, como la mutación *IDH* y el grado de metilación del promotor del gen *MGMT*.

A pesar del tratamiento estándar, consistente en cirugía seguida de regímenes de radioterapia y temozolamida, la recidiva o progresión es la norma en casi la totalidad de los pacientes. En este contexto, existen múltiples opciones terapéuticas entre las que se encuentran la reintervención, re-irradiación, quimioterapia adicional y nuevas estrategias de inmunoterapia o tratamientos dirigidos al genotipo. A día de hoy, ninguna alternativa ha demostrado una clara superioridad en términos de aportar mayor supervivencia tras la progresión.

Además, el análisis de la reintervención ha demostrado resultados contradictorios en las publicaciones científicas, debido a sesgos de selección, y es probable que beneficie únicamente a un pequeño número de pacientes.

Por otro lado, se han descrito variaciones en el perfil de metilación *MGMT* en reintervenciones, como respuesta a distintos factores, entre los que se incluye la exposición a temozolamida. Algunos autores han intentado cuantificar estas alteraciones con resultados inconsistentes.

El presente trabajo intenta determinar la influencia pronóstica de la reintervención en una serie de pacientes afectos de gliomas de alto grado y posteriormente analizar los cambios del perfil de metilación del promotor de gen *MGMT* que se producen en los pacientes reintervenidos tras la exposición a radio y quimioterapia.

Métodos: Cuatrocientos veintisiete pacientes fueron diagnosticados de gliomas de alto grado entre 2005 y 2019 en nuestro centro. Con el fin de evitar sesgos inherentes de selección, los sujetos diagnosticados mediante biopsia, aquellos que no recibieron tratamiento

complementario tras la primera cirugía o los que no fueron tratados activamente en la progresión fueron excluidos del estudio. Se aplicaron modelos de regresión uni y multivariantes de Cox modelando la supervivencia global y la supervivencia tras la progresión, considerando también la reintervención como una covariable tiempo-dependiente. En los pacientes reintervenidos de glioblastoma, se practicó un análisis retrospectivo del grado de metilación en las muestras de la primera y de la segunda intervención, utilizando la pirosecuenciación como método de diagnóstico molecular.

Resultados: En la progresión, 33 pacientes con glioblastoma fueron reintervenidos mientras que 84 fueron tratados directamente con quimioterapias de segunda línea. La supervivencia global fue mayor en el grupo de reintervenidos, no así la supervivencia a partir de la progresión. La reintervención no mostró tener impacto pronóstico significativo en los modelos multivariantes de Cox.

Con respecto a los gliomas grado III, un nuevo procedimiento podría brindar mayor supervivencia, aunque los resultados presentan una limitación por el escaso número muestral.

En 25 pacientes reintervenidos por glioblastoma, se realizó un análisis de muestras pareadas del grado de metilación del promotor *MGMT*. Aunque todos habían recibido tratamiento con temozolamida, en un 40% de los casos se observó incremento o disminución del grado de metilación del promotor en las muestras procedentes de la segunda cirugía respecto de las de la primera intervención. Asimismo, considerando el grado de metilación como variable categórica o cuantitativa continua, se objetivó una correlación entre el grado de metilación del promotor en la primera intervención y la supervivencia global.

Conclusiones: A pesar de las indicaciones estrictas y los buenos resultados técnicos de las reintervenciones en nuestra serie, no observamos un claro beneficio pronóstico. La asociación de este procedimiento con una mayor supervivencia en algunas series de la literatura podría

estar infuida por sesgos de selección de los pacientes y por el hecho de no haber considerado la reintervención como covariable dependiente del tiempo.

Las variaciones en el patrón de metilación del promotor de *MGMT* se produjeron en algunos pacientes y en ambas direcciones, a pesar de la homogeneidad en términos de tratamiento quimioterápico.

Antecedents: Els gliomes d' alt grau continuen sent una patologia associada a mal pronòstic vital de forma general, tot i que amb diferències marcades pels seus atributs moleculars, com la mutació *IDH* i el grau de metilació del promotor del gen *MGMT*.

Tot i el tractament estàndard, consistent en cirurgia seguida de règims de radioteràpia i temozolamida, la recidiva o progressió és la norma en gairebé la totalitat dels pacients. En aquest context, hi ha múltiples opcions terapèutiques entre les quals hi ha la reintervenció, reirradiació, quimioteràpia addicional i noves estratègies d'immunoteràpia o tractaments dirigits al genotip. A dia d'avui, cap alternativa ha demostrat una clara superioritat en termes d'aportar més supervivència després de la progressió.

D'altra banda, s'han descrit variacions al perfil de metilació *MGMT* en reintervencions, com a resposta a diferents factors, entre els quals s'inclou l'exposició a temozolamida. Alguns autors han intentat quantificar aquestes alteracions amb resultats inconsistents.

Aquest treball intenta determinar la influència pronòstica de la reintervenció en una sèrie de pacients afectes de gliomes d'alt grau i posteriorment analitzar els canvis del perfil de metilació del promotor de gen *MGMT* que es produeixen en els pacients reintervinguts després de l'exposició a ràdio i quimioteràpia.

Mètodes: Quatre-cents vint-i-set pacients van ser diagnosticats de gliomes d'alt grau entre 2005 i 2019 al nostre centre. Per tal d'evitar biaixos inherents de selecció, els subjectes diagnosticats mitjançant biòpsia, aquells que no van rebre tractament complementari després de la primera cirurgia o els que no van ser tractats activament a la progressió van ser exclosos de l'estudi. Es van aplicar models de regressió uni i multivariants de Cox modelant la supervivència global i la supervivència després de la progressió, considerant també la reintervenció com una covariable temps-dependent. En els pacients reintervinguts de

glioblastoma, es va practicar una anàlisi retrospectiva del grau de metilació a les mostres de la primera i de la segona intervenció, utilitzant la piroseqüenciació com a mètode de diagnòstic molecular.

Resultats: A la progressió, 33 pacients amb glioblastoma van ser reintervinguts, mentre que 84 van ser tractats directament amb quimioteràpies de segona línia. La supervivència global va ser superior en el grup de reintervinguts, no així la supervivència a partir de la progressió. La reintervenció no va demostrar tenir impacte pronòstic en els models multivariants de Cox.

Pel que fa als gliomes grau III, un nou procediment podria brindar més supervivència, encara que els resultats presenten una limitació per l'escàs nombre mostral.

En 25 pacients reintervinguts de glioblastoma, es va realitzar un anàlisi de mostres aparellades del grau de metilació del promotor de *MGMT*. Tot i que tots van rebre quimioteràpia amb temozolamida, es van objectivar en el 40% dels casos, un increment o una disminució del grau de metilació del promotor a les mostres procedents de la segona cirurgia en comparar-les amb les de la primointervenció. Així mateix, considerant el grau de metilació com a variable categòrica o quantitativa contínua, es va objectivar una correlació entre el grau de metilació del promotor a la primera cirurgia i la supervivència global.

Conclusions: Malgrat les escrites indicacions i els bons resultats tècnics de les reintervencions a la nostra sèrie, no observem un avantatge pronòstic. L'associació d'aquest procediment amb una major supervivència en algunes sèries la literatura podria estar influïda per alguns biaixos de selecció i per el fet de no haver considerat la reintervenció com a covariable dependent del temps.

Les variacions al patró de metilació del promotor de *MGMT* es van produir en alguns pacients i en ambdues direccions, malgrat l'homogeneïtat en termes de tractament quimioteràpic.

Background: High-grade gliomas continue to be a poor-prognosis, although with marked differences due to their molecular attributes, such as *IDH* mutation and the degree of methylation of the *MGMT* promoter gene.

Despite standard treatment, consisting of surgery followed by radiotherapy and temozolomide regimens, recurrence or progression is the norm in almost all patients. Multiple treatment options at glioblastoma progression exist, including reintervention, reirradiation, additional systemic therapy, and novel strategies. To date, no alternative has shown clear superiority of providing greater survival after progression.

A second surgery has shown conflicting evidence in the literature regarding its prognostic impact, possibly affected by selection bias, and might benefit a sparse subset of patients with recurrent glioblastoma.

On the other hand, variations in the *MGMT* methylation profile have been described in reinterventions in response to different factors, including exposure to temozolamide. Some authors have tried to quantify these alterations with inconsistent results.

The present work aims to determine the prognostic influence of reintervention in a series of patients affected by high-grade glioma and subsequently to analyse changes in the methylation profile of the *MGMT* promoter that may occur in reoperated patients after exposure to radio and chemotherapy.

Methods: Four hundred twenty-seven patients were diagnosed with high-grade glioma between 2005 and 2019 in our institution. In order to avoid inherent selection bias, subjects diagnosed by biopsy, those who did not receive oncological treatment after the first surgery, or those who were not actively treated at progression were excluded from the analysis. In glioblastoma reoperated patients, a retrospective analysis of the degree of methylation in paired samples was performed, using pyrosequencing as the molecular diagnostic technique.

Univariate and multivariate Cox regression models were applied, modelling overall survival and post-progression survival, also considering reintervention as a time-dependent covariate.

Results: At progression, 33 glioblastoma patients underwent reoperation, and 84 received second-line chemotherapy. Overall survival, but not post-progression survival, was higher in the reoperated group. However, treatment modality did not show significant impact in our multivariate Cox regression models considering overall or post-progression survival as the endpoints.

Regarding grade III gliomas, a new procedure could provide better survival, although the small sample size limits the results.

Analysis of the degree of *MGMT* promoter methylation was performed in paired samples of 25 glioblastoma reoperated patients. Albeit all patients had received temozolomide, an increase or a decrease in the degree of methylation was observed in 40% of the cases when comparing samples from the second surgery with those from the first surgery. Likewise, considering methylation as a continuous or categorical variable, a correlation between the degree of methylation of the promoter in the first surgery and overall survival was observed.

Conclusions: Despite selective indications and good technical results in reinterventions in our series, we did not observe a clear prognostic benefit. The association of this procedure with increased survival in some series of the literature could be influenced by patient selection biases and with the fact that reintervention has not been considered as a time-dependent covariate.

Variations in the *MGMT* promoter methylation pattern occurred in some patients and both directions, despite all patients being treated with temozolamide.

INTRODUCCIÓN

**A. ASPECTOS CLINICOS GENERALES DE
LAS RECIDIVAS DE GLIOMAS DE ALTO
GRADO**

A.1. CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO

El término glioma fue acuñado por Virchow en 1883 para definir aquellas neoplasias primarias del sistema nervioso originadas a partir de células gliales. Varias décadas más tarde (1926), Bailey y Cushing intentaron por primera vez clasificar las lesiones en función de la morfología de las células. Su estudio piloto introduce el concepto de que la supervivencia de los enfermos se relaciona con aspectos histopatológicos del tumor, tales como la atipia nuclear, la celularidad, la proliferación vascular o la necrosis. A día de hoy, en la investigación dirigida al conocimiento de los factores pronósticos de supervivencia y predictivos de respuesta a la terapéutica de estos tumores, la clasificación histopatológica sigue siendo de interés prioritario. La categorización universalmente aceptada es la elaborada por la OMS, que data de 1993 y que fue actualizada por última vez en 2021 (Louis et al., 2021).

Los gliomas representan la mayoría de tumores cerebrales primarios y reciben ese nombre por su similitud histológica con algunas células gliales (astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias...). Clásicamente, estas lesiones se han dividido en gliomas de bajo y de alto grado. Las primeras presentan un crecimiento más lento y una mayor supervivencia (equivalente a los grados I y II de la clasificación de la OMS), mientras que las últimas comportan un curso más agresivo, mayores tasas de recurrencia de la enfermedad y un pronóstico vital limitado (equivalente a los grados III y IV de la clasificación de la OMS). En la actualidad, no se recomienda el uso de estos términos, debido a que pueden agrupar

entidades muy heterogéneas, con aspectos biológicos diversos e implicaciones terapéuticas diferentes.

La clasificación de la OMS de los tumores del sistema nervioso central (SNC) del 2016, considera, por primera vez, características tanto histológicas como moleculares. Así, por ejemplo, en los tumores de origen glial, se establece una diferencia clave en función de si existe una mutación del gen que codifica el enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH), que confiere mejor pronóstico a estas lesiones de forma significativa (Louis et al., 2016). Las entidades patológicas conocidas previamente como gliomas de alto grado incluyen en dicha clasificación:

- Astrocitoma anaplásico IDH-mutado: Pertenece al grado III de la OMS: Exhiben una celularidad elevada, atipia nuclear, hiper cromasia y figuras de mitosis, sin observarse fenómenos de proliferación endotelial o necrosis. El pronóstico de este subtipo molecular es mejor, con medianas de supervivencia que pueden alcanzar los 10 años (Reuss et al., 2015).
- Astrocitoma anaplásico IDH-no mutado “wildtype”: También pertenecen al grado III de la OMS y son indistinguibles desde el punto de vista microscópico a los tumores con IDH-mutado. Sin embargo, su pronóstico es considerablemente peor y comparten algunas alteraciones moleculares con los glioblastomas IDH-wildtype, como la amplificación del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (EGFR).
- Oligodendroglioma anaplásico IDH-mutado con codelección 1p/19q: Pertenecientes al grado III de la OMS, son tumores que exhiben celularidad incrementada, alto índice mitótico y proliferación microvascular. Es característica

la alteración en la estructura cromosómica, con pérdida de los brazos 1p y 19q, debido a una alteración en la translocación de los cromosomas 1 y 19. Dicha anomalía concede un mejor pronóstico a estos tumores y está invariablemente ligada a la mutación de *IDH*. La significancia pronóstica entre los oligodendrogliomas sin características anaplásicas (grado II de la OMS) y los oligodendrogliomas anaplásicos no está bien definida y parece menos importante de lo que se creía previamente (Olar et al., 2015).

- Glioblastoma *IDH*-mutado: Suponen aproximadamente el 10% de los glioblastomas y frecuentemente existe un antecedente de glioma de menor grado en el paciente. Tienden a aparecer en sujetos más jóvenes con un pronóstico más favorable, ya que la mediana de supervivencia es dos veces superior a los glioblastomas *IDH-wildtype* (Nobusawa et al., 2009). Mediante microscopía óptica, suelen ser indistinguibles de sus homólogos, aunque presentan con menor frecuencia necrosis en empalizada y suelen contener células con morfología oligodendroglial.
- Glioblastoma *IDH-wildtype*: Es el tumor primario más frecuente en adultos. Estas lesiones son densamente celulares, con altos índices mitóticos y presentan proliferación microvascular, necrosis o ambas. Existen varios subtipos histológicos calificados por la OMS: glioblastoma de células gigantes, gliosarcoma y glioblastoma epitelioide. Este último debe su nombre a la apariencia epitelioide en los cortes histológicos y presenta varias particularidades como la aparición en zonas más superficiales y pacientes más jóvenes, mutación *BRAF V600E* y peor pronóstico.

- Glioma difuso de línea media, con mutación *H3 K27M*: Es una entidad de nueva aparición relacionada con mutaciones en las histonas, y se describe como una lesión infiltrativa con características predominantes de astrocitoma que asienta sobre estructuras de línea media, como tronco encefálico, tálamo o médula espinal. Típicamente se presenta en pacientes pediátricos con especial mal pronóstico, aunque se han descrito casos en la edad adulta.
- Clasificación NOS: La designación NOS “*not otherwise specified*” se aplica para todos los tumores anteriores cuando no es posible realizar una nomenclatura integrada de atributos histopatológicos y moleculares debido a que el análisis genético completo no se pudo realizar o no fue concluyente. Así, cuando se presenta esta circunstancia, se debe emitir el diagnóstico de astrocitoma anaplásico NOS; glioblastoma NOS; u oligodendroglioma anaplásico NOS. El diagnóstico de oligoastrocitoma desaparece de la nueva clasificación de la OMS, ya que los tumores con histología mixta y rasgos moleculares de astrocitoma son catalogados como astrocitomas y viceversa. Por eso, el término oligoastrocitoma anaplásico NOS se reserva para lesiones con características histológicas de ambos tipos y estudio molecular no realizado o inconcluyente.

En el transcurso de la escritura de esta tesis doctoral tiene lugar una nueva actualización en la clasificación de la OMS (Louis et al., 2021). Con respecto a la patología que nos ocupa, los gliomas se escindirán entre los de aparición frecuente en el adulto y los que se presentan mayoritariamente en la edad pediátrica. Con respecto a los de “tipo adulto”, se distinguen tres escenarios, en los que se agrupan tumores antiguamente considerados distintos, pero que comparten características moleculares:

- Astrocitoma, IDH-mutado: Se engloban en esta categoría todos los tumores de origen astrocítico con mutación *IDH1* o *IDH2*. Teniendo en cuenta la actualización de 2016, dicha categoría engloba los astrocitomas difusos (grado II), los astrocitomas anaplásicos *IDH* mutado (grado III) y los glioblastomas *IDH*-mutado (grado IV). La gradación no se basa exclusivamente en criterios histológicos, sino que el hallazgo de delección homocigota de *CDKN2A* y/o *CDKN2B* es condición suficiente para considerar un glioma de grado IV incluso en ausencia de proliferación microvascular o de necrosis.
- Oligodendroglioma IDH-mutado con codelección 1p/19q: Incluye tanto los oligodendrogliomas grado II como los de grado III siempre que exhiban estas alteraciones genéticas.
- Glioblastoma IDH-wildtype: Esta categoría incluirá los tumores de origen astrocítico sin detección de mutaciones *IDH1* o *IDH2*, por lo que engloba el astrocitoma *IDH-wildtype* grado III y el glioblastoma *IDH-wildtype* (grado IV), en presencia de proliferación microvascular, necrosis, mutación del promotor de *TERT*, amplificación de *EGFR*, o una alteración numérica de los cromosomas 7 y 10.

Tumor Type	Genes/Molecular Profiles Characteristically Altered*
Astrocytoma, IDH-mutant	<i>IDH1, IDH2, ATRX, TP53, CDKN2A/B</i>
Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q-codeleted	<i>IDH1, IDH2, 1p/19q, TERT promoter, CIC, FUBP1, NOTCH1</i>
Glioblastoma, IDH-wildtype	<i>IDH-wildtype, TERT promoter, chromosomes 7/10, EGFR</i>

Figura 1. Alteraciones moleculares características de los gliomas de tipo adulto en la última actualización de la OMS (Louis et al., 2021). Dichas anomalías se describirán en el apartado A5 de la Introducción

Con el objetivo de caracterizar y redefinir mejor los gliomas, es posible que nuevos aspectos moleculares se añadan a los preexistentes en clasificaciones futuras, ya que el análisis morfológico puede implicar cierta variabilidad interobservador entre patólogos. Para solventar este problema, la actualización de la clasificación de la OMS incluye ya la agrupación basada en aspectos de medicina molecular en algunas entidades seleccionadas como el meduloblastoma. De especial interés en este ámbito podemos resaltar los cambios epigenéticos, y dentro de ellos el perfil de metilación del ADN, que se estudiará con detalle en el apartado siguiente. El perfil de metilación del ADN se ha propuesto como herramienta robusta y de fácil reproducibilidad, útil para la creación de subtipos de tumores del sistema nervioso central que presentan un comportamiento clínico diferente y que previamente eran considerados entidades homogéneas. Dichos hallazgos se han descrito para identificar un posible subtipo molecular de ependimoma que podría beneficiarse de quimioterapia dirigida (Mack et al., 2014) y también para diferenciar subtipos pronósticos en tumores de plexos coroides (Thomas et al., 2016) o astrocitomas anaplásicos, entre otros (Wiestler et al., 2014). Siguiendo esta corriente de investigación, Capper y colaboradores han propuesto una clasificación de tumores del SNC basada en los diferentes perfiles de metilación de ADN que presentan las lesiones (Capper et al., 2018).

No cabe duda que en los años venideros, las alteraciones identificadas en medicina molecular y genética complementarán a la histopatología y redefinirán no sólo las clasificaciones, si no también, la terapéutica de estas lesiones.

A.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO

Los datos epidemiológicos más actualizados y detallados en referencia a los tumores del sistema nervioso central proceden de bases de datos de los Estados Unidos. El último informe de la CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States*) corresponde al periodo 2014-2018 y fue publicado en 2021 (Ostrom et al., 2021).

Según los datos recogidos, la tasa de incidencia anual de tumores cerebrales ajustada a la edad por cada 100.000 habitantes es de 24.25, siendo más frecuentes los tumores benignos (17.18 casos/100.000 habitantes/año) que los malignos (7.06 casos/100.000 habitantes/año).

Focalizando en los gliomas, los autores calculan que estos representan aproximadamente el 24.5% de los tumores del sistema nervioso central y casi el 81% de los tumores malignos. Aunque pueden originarse en cualquier zona del SNC, su localización es predominantemente supratentorial, aconteciendo fundamentalmente en los lóbulos temporal y frontal de los hemisferios cerebrales. Como puede observarse en la figura 2, el glioblastoma supone más de la mitad de los casos de esta amplia categoría, seguido de gliomas de alto grado sin definición de sus características moleculares y del astrocitoma difuso (correspondiente al grado II de la OMS). En conjunto, los tumores de origen astrocítico (incluyendo el glioblastoma) suponen aproximadamente el 77.5% de todos los gliomas.

Desde las series clásicas, todos los gliomas de alto grado aparecen con mayor frecuencia en individuos del sexo masculino y de raza blanca. Según el informe de la CBTRUS, la incidencia del glioblastoma y del astrocitoma anaplásico es 1.6 y 1.3 veces mayor en varones respectivamente, mientras que estas cifras ascienden a 1.9 y 2.1 al comparar la raza blanca con la negra.

Distribución de los gliomas del SNC por diagnósticos histológicos según los datos de la CBTRUS (n=105.729) (adaptado de Ostrom et al, 2021).

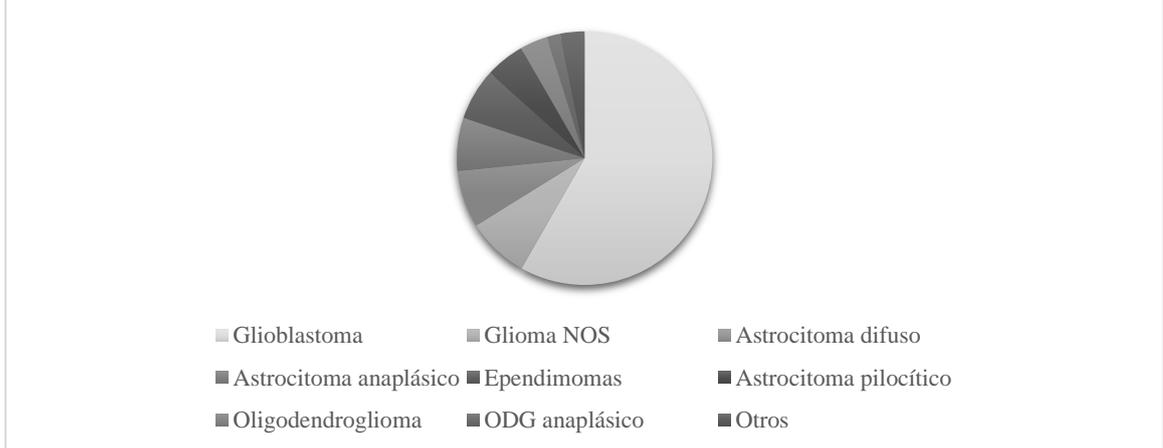


Figura 2. Distribución por diagnósticos histológicos de distintos tipos de glioma. (Adaptado de Ostrom et al, 2021)

Debido a su mayor prevalencia, los datos de la CBTRUS otorgan un apartado específico al glioblastoma. Esta entidad histológica supone la tercera patología en incidencia en los tumores primarios del SNC (tras meningiomas y tumores hipofisarios; 14.3% de todos primarios) y el tumor primario maligno más frecuente (49.1% de todos los malignos primarios). Su diagnóstico es mucho más frecuente en adultos que en pacientes menores de 20 años, grupo en el que supone menos del 3% del total de diagnósticos. Además, su incidencia aumenta con la edad, con tasas más altas en sujetos comprendidos en la franja etaria entre 75 y 84 años. Desafortunadamente, la tasa de largos supervivientes sigue siendo baja, estimándose en un 6.8% de los casos.

Por primera vez, el informe de la CBTRUS recoge la frecuencia de los subtipos patológicos en función de atributos moleculares. La tabla 1 demuestra los resultados obtenidos, en la que puede observarse que la mutación de *IDH* es mucho más frecuente en oligodendrogliomas o astrocitomas anaplásicos que en glioblastomas.

Histología	Frecuencia
Astrocitoma anaplásico	
Astrocitoma anaplásico <i>IDH</i> -mutado	42.6%
Astrocitoma anaplásico <i>IDH</i> -wildtype	42.6%
Astrocitoma anaplásico NOS	14.7%
Oligodendroglioma anaplásico	
Oligodendroglioma anaplásico <i>IDH</i> -mutado, con codelección <i>1p19q</i>	91.9%
Oligodendroglioma anaplásico	11.1%
Glioblastoma	
Glioblastoma <i>IDH</i> -wildtype	74.2%
Glioblastoma NOS	21.1%
Gliosarcoma	2.0%
Glioblastoma <i>IDH</i> -mutado	2.0%
Glioblastoma de células gigantes	0.7%

Tabla 1. Distribución de los gliomas de alto grado en función de atributos moleculares según los datos de la CBTRUS. (Adaptado de Ostrom et al, 2021)

A.3. PRESENTACIÓN CLÍNICA, DIAGNÓSTICO Y MANEJO INICIAL DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO

A.3.1. Presentación clínica

Los pacientes afectados de lesiones gliales de alto grado suelen procurar atención médica debido a signos y síntomas neurológicos que progresan en el curso de días o semanas, dependiendo de la localización y el tamaño de la lesión. No existen síntomas patognomónicos o específicos de estos tumores, y son similares a los producidos por otros tipos de masas cerebrales primarias o metastásicas.

Los síntomas de presentación más frecuentes incluyen cefalea (50-60%), crisis epilépticas (20-40%) y déficits neurológicos focales como hemiparesia, defectos campimétricos, trastorno del lenguaje, alteraciones cognitivas o afectivas (10-40%) (Chang et al., 2005). Los déficits focales son más frecuentes en glioblastomas, mientras que el debut con síntomas epilépticos aparece con mayor regularidad en gliomas anaplásicos. Es poco frecuente que el cuadro se presente como gliomatosis meníngea, ya que esta entidad suele aparecer en estadios más avanzados del curso de la enfermedad.

A.3.2. Neuroimagen

La herramienta diagnóstica más utilizada para el estudio preoperatorio es la resonancia magnética (RM) con contraste. Desde el punto de vista de la neuroimagen, los gliomas de alto grado aparecen como lesiones hipointensas en las secuencias T1 y exhiben una captación heterogénea e irregular tras la administración de gadolinio. Característicamente

muestran una intensa captación en la periferia, que indica la extravasación de gadolinio que indica disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE), mientras que la parte central no suele captar, sugestivo de extensas áreas de necrosis. Además, suelen ser hiperintensos en secuencias T2 y FLAIR. Una minoría de gliomas de alto grado puede no presentar captación de contraste y manifestarse como lesiones infiltrativas que se visualizan como alteraciones de señal en secuencias T2.

La heterogeneidad de los gliomas es un hecho conocido desde hace décadas y dicha característica se hace patente en su expresión radiológica. Debido a esto, siguen existiendo dificultades a la hora del diagnóstico y la planificación del tratamiento de estas lesiones. Por ejemplo, existe evidencia científica que demuestra que considerar que el área captante de contraste como el límite de un glioblastoma, puede infraestimar el límite tumoral real. Esto es debido a que pueden existir porciones del tumor en las que se preserve la barrera hematoencefálica y por tanto no capten contraste (Sarkaria et al., 2018). Dichas regiones pueden ser infratratadas en la cirugía lo que contribuiría a recurrencias precoces o malos resultados clínicos.

Otro aspecto a tener en cuenta es la significación de las anomalías de señal detectadas en secuencias T2/FLAIR en zonas periféricas a las áreas de captación. Aunque existe una predominancia de edema vasogénico, estas áreas pueden contener una cantidad variable de tejido tumoral infiltrante. La planificación del tratamiento radioterápico incluye márgenes tumorales y por lo tanto parte de estas zonas de señal anómala; ahora bien, es posible que algunas áreas no infiltradas por la lesión sean expuestas a irradiación de forma innecesaria, y simultáneamente que otras áreas con celularidad maligna reciban dosis infraterapéuticas (Hu et al., 2020).

Estos y otros problemas han suscitado un gran interés por las nuevas modalidades de neuroimagen avanzada. Entre ellas destacan:

- Espectroscopia (MRS): Mide de manera específica algunos metabolitos tisulares. En el caso de los gliomas de alto grado, el área de lesión se caracteriza por un pico de colina elevado y disminución del pico de N-acetilaspártato en comparación con el tejido sano. Se acepta actualmente que un aumento en el pico de colina traduce una producción elevada de membrana celular atribuible al crecimiento del tumor y a la destrucción de células sanas, mientras que una disminución de N-acetilaspártato refleja el grado de destrucción neuronal. Además, recientes avances con esta técnica permiten incluso inferir de manera no invasiva atributos moleculares, como la mutación del enzima IDH. En este caso, el hallazgo de niveles incrementados del metabolito 2-hidroxiglutarato son sugestivos de tumores con este tipo de mutación, mientras que los tumores *IDH*-wildtype presentarían valores dentro de la normalidad (Choi et al., 2016).
- RM con tensor de difusión (DTI): Cuantifica el grado de anisotropía de las moléculas de agua en los tejidos. Su aplicación en neuroimagen permite ilustrar los tractos de sustancia blanca debido al movimiento direccional de las moléculas sobre ellos, así como las desviaciones o disrupciones producidas por lesiones tumorales (Mori et al., 2002)
- Estudios de perfusión por RM: Existen diferentes modalidades para realizar estudios de perfusión. La técnica más utilizada es la imagen dinámica de susceptibilidad ponderada en T2, que cuantifica el decremento en la intensidad de señal que se produce tras la administración de gadolinio, para proporcionar un valor de volumen sanguíneo cerebral relativo (VSCr). Este parámetro se

correlaciona con la densidad de la microvasculatura en el voxel estudiado y no depende de la integridad de la BHE, por lo que puede no corresponderse con las áreas de captación de contraste. En general, los gliomas de alto grado exhiben valores elevados de VSCr en comparación con gliomas de bajo grado o procesos de etiología inflamatoria (Guzmán-De-Villoria et al., 2012). Existe también la posibilidad de realizar un estudio de perfusión dinámica ponderado en T1, que sí es dependiente de la disrupción de la BHE y representa la rapidez en la que se produce la extravasación de contraste paramagnético.

- Tomografía de emisión de positrones (PET): Esta prueba de medicina nuclear detecta la distribución anatómica de sustratos a los que se ha añadido un isótopo emisor de positrones. Uno de los isótopos más empleados es la 18-fluorodesoxiglucosa por su elevada vida media. En el SNC, sin embargo, se evidencia una aplicabilidad más limitada debido al elevado metabolismo basal de glucosa en el cerebro normal. Es por ello que los radiotrazadores que combinan el 18-fluoro con análogos de aminoácidos han demostrado una gran utilidad en neurooncología, entre los que destacan 18F-fluoro-etil-tirosina y 18F-fluoro-DOPA. Algunas de sus ventajas incluyen la alta acumulación en células de origen tumoral, baja actividad en tejido cerebral normal y la habilidad para cruzar la BHE, por lo que podría ayudar en la detección de zonas de tejido tumoral no captantes de contraste (Rapp et al., 2013).

Aunque los avances en la neuroimagen y las diversas modalidades de RM permiten una mejor caracterización de los gliomas, el estándar de oro sigue siendo el estudio histológico del tejido, y por el momento, la radiología no sustituye en el momento actual al análisis proporcionado por el patólogo.

A.3.3. Opciones de tratamiento quirúrgico

El tratamiento suele comenzar con un enfoque quirúrgico con un doble propósito: establecer un diagnóstico certero mediante su caracterización molecular y extirpar la totalidad de la lesión, si es posible por la localización, para mejorar el pronóstico vital del enfermo, disminuir el edema y el efecto de masa que suelen ir asociados.

Las lesiones localizadas en los ganglios basales, estructuras diencefálicas o en áreas de parénquima con gran elocuencia no suelen ser subsidiarias de resección radical, por lo que en general se practica una biopsia diagnóstica para el análisis anatomopatológico. Las biopsias cerebrales con uso de marco estereotáctico o guiadas por sistemas de neuronavegación suelen ser procedimientos seguros y precisos, con un rendimiento diagnóstico cercano al 90% y una baja incidencia de complicaciones entre las que destacan déficits neurológicos transitorios o permanentes y hemorragias postoperatorias (Woodworth et al., 2006).

Las lesiones accesibles quirúrgicamente en pacientes sin riesgo anestésico excesivo deben ser tratadas mediante resección microquirúrgica. El objetivo en estos casos es la exéresis total, definida como la resección del área captante de contraste en tumores que tengan esta característica, cuando sea posible teniendo en cuenta que han de preservarse las principales funciones neurológicas (Domino et al., 2020). Aunque no existe evidencia científica basada en estudios aleatorizados, numerosos estudios observacionales y meta-análisis demuestran que el grado de resección es un factor pronóstico independiente que se correlaciona con un mejor estado funcional y de una mayor supervivencia global (OS, *overall survival* en inglés) y un mayor intervalo libre de progresión (PFS, *progression-free survival*) de estos enfermos (Brown et al., 2016). Otros estudios han intentado identificar de forma

retrospectiva un posible valor umbral en términos de resección a partir del cual se alcanza un beneficio significativo en la supervivencia. Según los trabajos, se han obtenido valores que oscilan entre superior al 70% (Chaichana et al., 2014) y al 98% (Lacroix et al., 2001).

Existen una serie de ventajas de la resección quirúrgica frente a la biopsia diagnóstica. En primer lugar, el volumen del tejido patológico que se envía para el análisis es mayor, lo que aumenta la probabilidad de un diagnóstico preciso. La heterogeneidad característica de los gliomas implica que en el mismo tumor puedan coexistir áreas de diferente grado histológico, habiéndose documentado discrepancias entre el diagnóstico emitido por biopsia y por resección que suponen casi un tercio de los casos en el trabajo de Jackson y colaboradores (R. J. Jackson et al., 2001). Por otro lado, se trata el efecto masa y edema asociados, disminuyendo los requerimientos de corticoesteroides.

A.3.4. Técnicas de imagen intraoperatoria

Para intentar alcanzar la resección total de la lesión, en los últimos años se han desarrollado diferentes herramientas quirúrgicas (Noh et al., 2021). La resonancia magnética intraoperatoria (RMi) es utilizada para la identificación de posibles residuos tumorales tras la resección inicial para su posterior exéresis. La eficacia de la RMi ha sido evaluada en un estudio aleatorizado, con mayores tasas de resección total y sin aumento del número de complicaciones (Senft et al., 2011), aunque su asociación con mejores cifras de supervivencia no está claramente determinada en una revisión sistemática tipo Cochrane en la que se analizan diferentes métodos de asistencia de imagen intraoperatoria (Fountain et al., 2021). La administración preoperatoria del fármaco oral ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) puede ayudar en la distinción del tejido patológico mediante el uso de microscopios quirúrgicos y

filtros luminosos especiales. El uso de 5-ALA mejora la visualización del tejido tumoral y puede permitir un mayor grado de resección (Mansouri et al., 2016) en especial, si es combinada con la RMI. Los avances en los nuevos equipos de ecografía intraoperatoria suponen en algunos aspectos que su utilidad como asistente quirúrgico supere incluso a otras técnicas como la navegación (Incekara et al., 2021). Sin embargo, su uso debe ser validado en futuros ensayos clínicos.

Desgraciadamente, a pesar de estos avances, las recidivas tumorales en el lecho quirúrgico son la norma en casi todos los pacientes, incluso en aquellos en los que se aprecia una aparente resección total en la neuroimagen postquirúrgica. Esto es debido a que los gliomas de alto grado son lesiones caracterizadas por poseer bordes mal definidos e infiltración neoplásica de las fibras de sustancia blanca y espacios perivasculares adyacentes, que normalmente se extienden más allá de los márgenes de la lesión definidos por el cirujano y por las pruebas de imagen.



Figura 4. Sistema de resonancia magnética intraoperatoria Polestar N20 (Medtronic) utilizado en el Hospital Son Espases desde el año 2011.

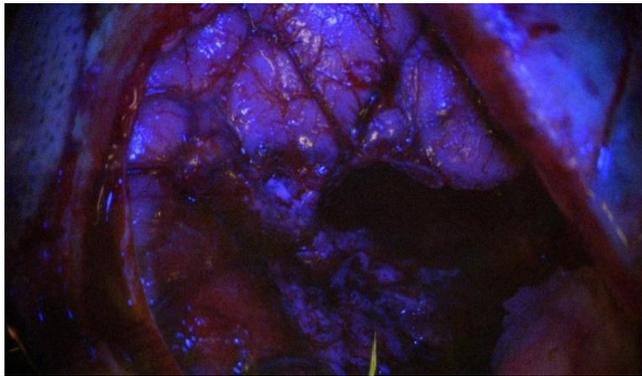
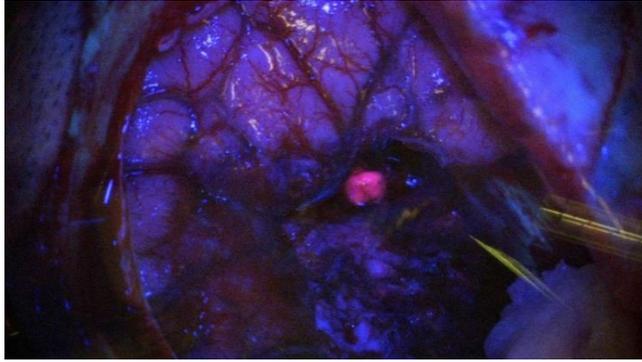


Figura 5. Imágenes intraoperatorias de fluorescencia oncológica proporcionadas por el 5-ALA. La imagen superior evidencia un nódulo fluorescente que corresponde a tejido tumoral. La imagen inferior muestra su exéresis completa.

A.4. TRATAMIENTO COMPLEMENTARIO DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO

Tras la confirmación histológica que se obtiene en la intervención quirúrgica, ya sea mediante biopsia o resección, los pacientes son valorados en un comité multidisciplinar en el que normalmente se propone al paciente el inicio del tratamiento complementario mediante radio y quimioterapia.

A.4.1. Radioterapia

La radioterapia adyuvante tiene como objetivo tratar la enfermedad residual microscópica, los restos tumorales o la lesión no resecada que pueden apreciarse en las pruebas de imagen postoperatorias. Se trata de un tratamiento no curativo, pero que mejora las tasas de control local y de supervivencia en comparación con la cirugía o los antineoplásicos en monoterapia (Corso et al., 2017). Aunque en un inicio se realizaba radioterapia holocraneal, hoy en día, el volumen tisular objeto de tratamiento radioterápico incluye el correspondiente a la lesión residual o la cavidad quirúrgica más un margen adicional. Dicha estrategia se basa en la observación de que la mayoría de las recurrencias de los gliomas de alto grado aparecen alrededor de los 2 cm de la lesión primaria, mientras que una minoría son multifocales. Estas conclusiones están basadas en la TC como prueba de imagen postoperatoria (Hochberg & Pruitt, 1980).

Según los grupos, la planificación del área a tratar suele incluir las anomalías de señal que se aprecian en secuencias T2 o FLAIR y un margen circunferencial variable (1 o 2 cm)

con el objetivo de incidir sobre la enfermedad microscópica, si bien se aceptan márgenes más estrechos.

La dosis aplicada en general es de 60 Gy mediante fracciones diarias de 2 Gy que se distribuyen a lo largo de 6 semanas. Este estándar terapéutico debe su razón a múltiples estudios que compararon la supervivencia de los enfermos tratados con esta dosis frente a aquellos que recibieron dosis postoperatorias menores (Cabrera et al., 2016). Dosis mayores a 60 Gy utilizando radioterapia fraccionada convencional o nuevas modalidades como la radioterapia hiperfraccionada, braquiterapia o radiocirugía estereotáctica no han demostrado un beneficio adicional en términos de supervivencia en comparación con la dosis estándar en combinación con temozolamida (Singh et al., 2021). La escalada de dosis con las nuevas modalidades radioterapéuticas en el tratamiento de lesiones captantes de contraste continúa siendo objeto de estudio y de ensayos clínicos actuales.

En nuestro centro se utiliza desde hace años la técnica conocida como arcoterapia volumétrica modulada (V-MAT). En este subtipo de radioterapia de intensidad modulada existe un sistema colimador de la radiación formado por láminas que se deslizan de forma dinámica en arcos coplanares y van generando haces de fotones con formas diferentes predefinidas por los profesionales. Esta metodología disminuye de forma eficiente la radiación que absorbe el área que no se desea tratar, con el consiguiente descenso en los efectos secundarios inducidos por la radioterapia (Narayana et al., 2006). Sin embargo, las tasas de control local se estiman similares a las obtenidas mediante radioterapia convencional.

Los efectos secundarios inducidos por la radiación dependen de la edad, dosis suministrada y área irradiada. A corto plazo destacan la pérdida de apetito, fatiga, dermatitis y

alopecia, mientras que a largo plazo pueden aparecer efectos negativos a nivel cognitivo con leucoencefalopatía asociada o endocrinopatías.

La terapia con protones podría ser considerada para pacientes con tumores que presentan un pronóstico vital favorable a largo plazo (grado III de la OMS que presentan mutación *IDH* o codelección *1p/19q*), con el objetivo de respetar las zonas adyacentes a la lesión y preservan la función cognitiva a medio o largo plazo (Shih et al., 2015).

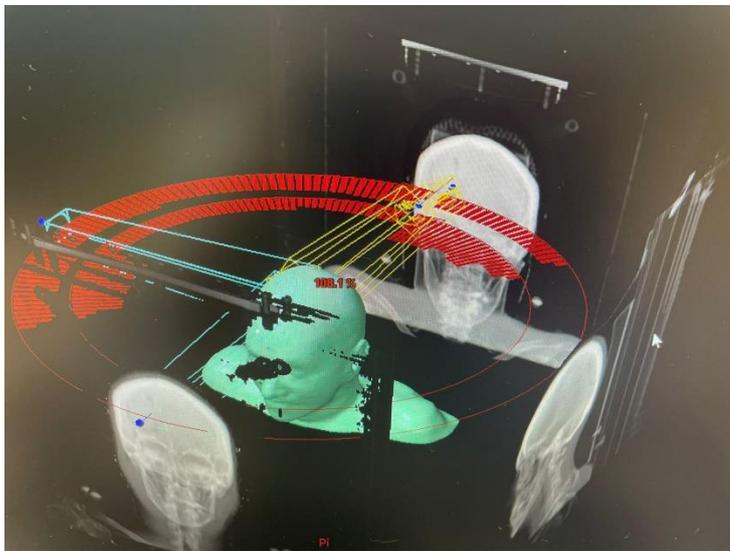


Figura 6. Ejemplo de V-MAT, en el que se aprecia que la dosis de radiación se administra mediante un giro continuado de 360° del acelerador.

A.4.2. Tratamiento sistémico

Con respecto a la quimioterapia, la selección del tratamiento para pacientes afectados de gliomas de alto grado depende cada vez más de la caracterización molecular además de factores clásicos como la edad o el estado funcional. Se recomienda la determinación la mutación del enzima IDH y el grado de metilación del promotor del gen *MGMT*. Como se citará con posterioridad en este capítulo, la metilación del promotor puede conducir a un

silenciamiento genético y a una ausencia de expresión de la proteína MGMT, cuya función principal es reparar las anomalías que pueden presentarse en el ADN. El grado de metilación se relaciona con una mejor respuesta tumoral a antineoplásicos como la temozolamida (TMZ) y a mayores índices de supervivencia.

La temozolamida es un agente alquilante de administración oral cuyo mecanismo de acción mayoritario consiste en añadir grupos metilo (alquilo) a residuos de guanina de la cadena de ADN, creando un daño en esta estructura y activando los procesos de muerte celular. Su principal indicación se establece como parte del tratamiento complementario en los gliomas de alto grado, con dosis que varían y se calculan en función del área corporal expresada en mg/m^2 . La TMZ puede inducir toxicidad hematológica, siendo la trombocitopenia el efecto adverso más frecuente, seguido de linfopenia o neutropenia. Por ello, se debe monitorizar a los pacientes con controles analíticos seriados y administrar antibióticos profilácticos para evitar cuadros de neumonía por *pneumocystis*. Los efectos tóxicos sobre el hígado se manifiestan frecuentemente con una elevación leve o moderada de las transaminasas, aunque también se han descrito reacciones hepatotóxicas severas o fatales. Otros efectos secundarios que se presentan con frecuencia al inicio de la terapia son las náuseas, anorexia o fatiga.

En pacientes menores de 70 años con tumores que presentan metilación del promotor del gen *MGMT* se recomienda el uso de TMZ en dosis de $75 \text{ mg}/\text{m}^2$ en combinación con radioterapia (60 Gy) seguido de un régimen semanal de TMZ adyuvante en dosis de $150\text{-}200 \text{ mg}/\text{m}^2$ distribuido durante 6 meses. Dichas recomendaciones tienen su origen en un estudio multicéntrico y aleatorizado que comparó el uso de radioterapia postoperatoria en

monoterapia frente a esta pauta, con mejorías en la supervivencia global y en la tasa de largos supervivientes (Stupp et al., 2005), aunque en ese estudio no se tuvo en cuenta la metilación del promotor del gen *MGMT*. Este hábito estandarizado recibe el nombre de régimen de Stupp en la práctica clínica habitual y se considera como estándar de oro en el tratamiento de los gliomas de alto grado de nueva aparición, frente al cual se comparan los regímenes terapéuticos emergentes.

En un análisis posterior, se estudió de forma retrospectiva la metilación del promotor *MGMT* de los pacientes del ensayo de Stupp y colaboradores, y se concluyó que dicha característica molecular era un factor pronóstico y predictivo independiente que confería mayor supervivencia y mayor tasa de respuesta a la TMZ. Por otro lado, en aquellos pacientes que no presentaban metilación positiva, la agregación de TMZ a la radioterapia apenas suponía algún incremento en la supervivencia (Hegi et al., 2005).

Estudios clínicos posteriores han intentado determinar si nuevas combinaciones de antineoplásicos pueden mejorar los datos de supervivencia en pacientes con metilación del promotor del gen *MGMT*. La administración concomitante de lomustina y TMZ se comparó con el régimen de Stupp en un ensayo aleatorizado con el resultado de un discreto aumento de la supervivencia, aunque con un leve incremento de toxicidad relacionada con los fármacos en el brazo de tratamiento tratado con dos antineoplásicos (Herrlinger et al., 2019).

La administración de más de 6 ciclos de TMZ adyuvante en pacientes que presentan la enfermedad estable en sus pruebas radiológicas de control no aporta beneficios terapéuticos. La evidencia científica para esta afirmación la aporta un estudio aleatorizado que comparó el uso de 6 ciclos extra (12 en total) frente al régimen terapéutico convencional, sin diferencias significativas en los índices de supervivencia o intervalos libres de progresión, pero con mayor toxicidad en el brazo de tratamiento extendido (Balana et al., 2020).

Los pacientes menores de 70 años con ausencia de metilación del promotor del gen *MGMT* muestran peores datos de supervivencia y menor respuesta a TMZ. Por ello, la búsqueda de alternativas a este fármaco es el objeto de estudio de recientes trabajos. Un reciente ensayo clínico aleatorizado comparó el régimen de Stupp frente a la administración de bevacizumab e irinotecan en combinación con radioterapia en pacientes que presentaban el promotor del gen *MGMT* no metilado. Se publicaron mayores tasas de intervalo libre de progresión en el brazo de tratamiento alternativo, pero sin diferencia alguna en la supervivencia global entre los grupos (Herrlinger et al., 2016). Por ello, a falta de una alternativa más eficaz, los pacientes que no presentan metilación del promotor *MGMT* siguen siendo tratados con radioterapia y TMZ.

Los pacientes mayores de 70 años, con comorbilidades importantes o puntuaciones bajas en escalas funcionales como la de Karnofsky (KPS, *Karnofsky Performance Scale*) o ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) merecen una mención especial. En ellos, debe valorarse especialmente el balance entre el beneficio terapéutico y el riesgo producido por la toxicidad de la quimioterapia o los efectos secundarios. Por esta razón, a menudo se adapta el tratamiento y se adoptan estrategias como la radioterapia hipofraccionada con dosis totales de 40 Gy, o la elección entre radio o quimioterapia, en la que, la determinación de la metilación del promotor del gen *MGMT* tiene un papel crucial (Zarnett et al., 2015).

El anticuerpo monoclonal bevacizumab se une de forma selectiva al factor de crecimiento endotelial vascular, por lo que, teóricamente, impide el crecimiento tumoral al bloquear la formación de nuevos vasos sanguíneos. Dos ensayos bien diseñados estudiaron si añadir bevacizumab al régimen de Stupp producía mejoras significativas en la supervivencia,

al compararlo con placebo (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014). En ambos estudios se observó que el intervalo libre de progresión era mayor en el brazo de tratamiento que incluía el bevacizumab, sin diferencias significativas en la supervivencia global y con mayores efectos secundarios derivados de la toxicidad del fármaco. El bevacizumab parece tener importantes efectos antiedema, que hace disminuir los requerimientos de corticoides, pero al no mejorar la supervivencia global y aumentar la toxicidad, no se recomienda como parte del esquema inicial de tratamiento en los gliomas de alto grado.

A.4.3. Tumor Treating Fields

Debido a los escasos avances en términos de supervivencia en los últimos años, una gran variedad de alternativas está siendo explorada en ensayos clínicos con el objetivo de la mejora pronóstica en estos pacientes. Entre ellas destaca la terapia con campos eléctricos alternos de baja intensidad, que ha demostrado un efecto antimitótico a nivel experimental y que podría interferir con los procesos de división celular. Esta estrategia recibe el nombre de terapia de campo de tumores (TTFs; *Tumor Treating Fields*) y ha sido recientemente aprobada por la administración de medicamentos y alimentos de los EEUU (FDA; *Food and Drug Administration*) tanto para el tratamiento del glioblastoma de nueva aparición como en las recidivas. Parece que la administración de TTFs afecta de forma selectiva a las células que presentan una rápida división celular causando un arresto mitótico y desembocando en procesos apoptóticos. El ensayo clínico que apoya la eficacia de este dispositivo externo comparó de forma aleatoria la temozolamida adyuvante tras radioterapia (brazo control) frente a TMZ en combinación con TTFs (Stupp et al., 2017), encontrándose diferencias leves pero significativas en el intervalo libre de progresión y en la supervivencia global. Esta

modalidad terapéutica presenta ciertas limitaciones, ya que los pacientes deben llevar el cabello rasurado para permitir la adhesión de los electrodos que están conectados a un dispositivo portátil que el paciente debe llevar más de 18 horas al día. Además, requiere una formación especializada por parte del facultativo tratante.

Nuevos tratamientos experimentales están en fase de ensayos clínicos y serán comentados de forma breve en el siguiente apartado.



Figura 7. Dispositivo NovoTTF-100A. La terapia con campos eléctricos alternos de baja intensidad supone una alternativa terapéutica tanto en gliomas de alto grado de nueva aparición como recidivados.

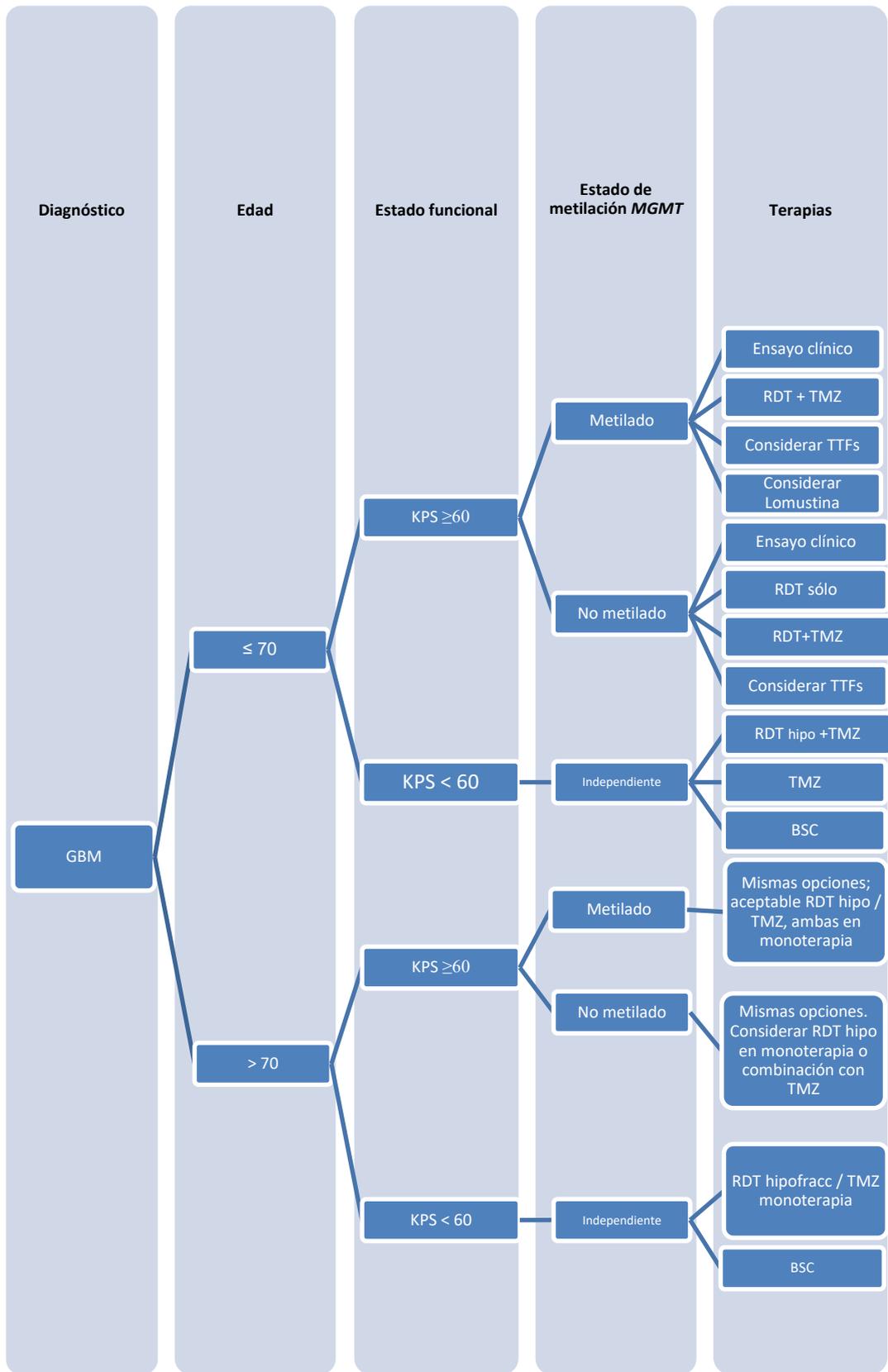
A.4.4. Algoritmos de manejo

La nueva clasificación de la OMS (Louis et al., 2021) plantea diferentes escenarios para los que la NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) determina algoritmos terapéuticos específicos (www.nccn.org/patients referencia 95).

-Independientemente del grado histológico, considerar, en primer lugar, la inclusión en algún ensayo clínico.

- Oligodendroglioma grado III, IDH-mutado, con codelección 1p/19q: Recomendación de radioterapia estándar acompañada de régimen PCV (procarbazona, lomustina y vincristina) neoadyuvante o adyuvante. También es posible considerar la TMZ.
- Astrocitoma IDH-mutado: Recomendación de radioterapia estándar con TMZ concomitante y posterior adyuvancia.
- Glioblastoma: El algoritmo terapéutico de la NCCN para los glioblastomas *IDH-wildtype* se especifica en la figura 8. Las opciones terapéuticas se consideran en función de la edad, estado funcional medido por la escala de Karnofsky y estado de metilación del promotor *MGMT*.

Figura 8 (página siguiente). Algoritmo de manejo propuesto por la NCCN para el glioblastoma IDH-wildtype. Adaptado de la versión 1.2022 de la NCCN (www.nccn.org). Leyenda: BSC: "Best Supportive Care": tratamiento sintomático, GBM: glioblastoma, KPS: puntuación en la escala de Karnofsky, RDT: radioterapia, TMZ: temozolamida TTFs: Tumor Treating Fields.



A.5. ASPECTOS PRONÓSTICOS DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO

A.5.1 Estudios poblacionales

Existen diferentes estudios poblacionales que han examinado las cifras de supervivencia en los pacientes afectados de glioblastoma. Por ejemplo, análisis de bases de datos de un elevado número de pacientes con diagnóstico de glioblastoma entre 2002 y 2010 en EEUU y Taiwán mostró que el porcentaje de enfermos que superaban los 12 meses de supervivencia tras el diagnóstico oscilaba entre un 38 y un 50%. La tasa de largos supervivientes (>5 años) se situaba entre el 5 y el 10% (Chien et al., 2016). Otros estudios poblacionales focalizan su atención en las leves mejorías de los datos de supervivencia que existen al comparar cohortes antiguas con otras más recientes. Un estudio suizo comparó las diferencias en los datos de supervivencia global que se encuentran en pacientes diagnosticados y tratados entre el periodo 1980-1994 y 2005-2009, concluyendo que ésta aumentaba de 4.9 a 11.5 meses (Gramatzki et al., 2016). De igual modo, un estudio basado en la población finlandesa observó este mismo fenómeno tanto en la población adulta general como en los mayores de 70 años (Korja et al., 2019).

A.5.2. Factores clínicos

Los factores pronósticos conocidos de mayor relevancia en los gliomas de alto grado son la edad y el estado funcional del paciente (Gittleman et al., 2017; Houillier et al., 2006; Lacroix et al., 2001; Li et al., 2011; Thakkar et al., 2014). Una publicación reciente que revisa factores de riesgo clínicos en pacientes que reciben tratamiento convencional con la intención

de crear un modelo pronóstico, encuentra que, la edad avanzada, el estado clínico según la escala ECOG (asintomático versus sintomático), el uso de corticoides y la enfermedad multifocal son las variables asociadas a peor pronóstico (Abedi et al., 2021). El empeoramiento de los datos de supervivencia en la población añosa ha sido atribuido a la mayor incidencia de comorbilidades en este grupo etario, peor capacidad de recuperación tras los daños cerebrales causados por la lesión o los tratamientos posteriores y al perfil molecular del propio tumor. Como se comentó con anterioridad, el grado de resección quirúrgica parece que influye en el pronóstico (Brown et al., 2016; Hu et al., 2022), aunque esto no ha podido ser demostrado en todas las series.

A.5.3. Factores moleculares

Los gliomas de alto grado exhiben una marcada heterogeneidad con respecto a sus alteraciones genéticas, y algunas de ellas implican una gran variabilidad pronóstica. Los dos factores que a día de hoy parecen poseer mayor relevancia son la metilación del promotor del gen *MGMT* y la mutación del gen que codifica el enzima IDH, aunque existen otros, como la amplificación del gen *EGFR*, la mutación de *TP53* y deleciones cromosómicas.

El mecanismo de acción del enzima MGMT, la metilación del promotor del gen *MGMT* y su relación con la supervivencia y la respuesta a agentes alquilantes se describirá con detalle en el próximo capítulo de la Introducción, ya ha sido objeto de discusión en el segundo capítulo de esta tesis. Sin embargo, en este apartado cabe destacar que múltiples estudios han confirmado que la metilación del promotor del gen *MGMT* es un factor pronóstico favorable e independiente de otros factores pronósticos conocidos y validados. Un

reciente meta-análisis de 11 cohortes concluyó que la metilación estudiada mediante el método de pirosecuenciación se relacionaba tanto con la supervivencia global como con el intervalo libre de progresión (H. Zhao et al., 2016). Además, parece que está en relación con una mayor respuesta a agentes alquilantes como la TMZ, aunque dicha asociación no ha sido confirmada en estudios de naturaleza prospectiva (Hegi et al., 2008). Se ha descrito en la literatura que el status de metilación puede ayudar en la decisión del mejor esquema terapéutico en pacientes de edad avanzada afectados de glioblastoma (Reifenberger et al., 2012) o predecir el patrón clínico radiológico de recurrencia (Brandes et al., 2009), siendo los tumores que presentan el promotor *MGMT* metilado, más propensos a recidivar fuera del área radiada. Es importante comentar, aunque se discutirá con mucho más detalle con posterioridad, que existen diferentes métodos en la práctica clínica para determinar el grado de metilación del promotor del gen *MGMT*, y no existe consenso en relación a cuál es el más óptimo (Brandner et al., 2021; McAleenan et al., 2019). La fiabilidad, disponibilidad y el coste varía según las técnicas, así como el valor umbral empleado para definir qué tumores son considerados metilados y cuáles no. Parece que la proporción de glioblastomas que presentan el promotor *MGMT* metilado oscila entre el 40 y 50%, aunque podemos encontrar un rango más amplio, siempre dependiendo del método de detección utilizado y de las características de la cohorte analizada (Wang et al., 2017).

IDH-wildtype corresponde a las siglas de isocitrato deshidrogenas. Es un enzima que interviene en el ciclo de Krebs, catalizando la transformación de isocitrato en α -cetoglutarato. Las mutaciones del enzima IDH pueden detectarse en una amplia variedad de tumores, pero no en células normales. Las mutaciones *IDH1 Arg132* e *IDH2 Arg140* y *Arg172* suponen más del 90% de las anomalías y favorecen la acumulación de un oncometabolito, el 2-

hidroxiglutarato, implicado en la génesis de gliomas. La frecuencia de mutaciones de *IDH1*, y menos frecuentemente de *IDH2*, es inversamente proporcional al grado histológico en los gliomas, estando presente únicamente en el 5 a 10% de los glioblastomas. Su presencia confiere una mejoría pronóstica, independientemente de otros factores pronósticos establecidos, implicando que los datos de supervivencia global se duplican o incluso se triplican si se comparan con los tumores *IDH-wildtype* del mismo grado histológico. Este hecho se repite en diferentes subtipos de gliomas; en un estudio en el que se analizaron más de 400 muestras, la mutación de *IDH1* estaba significativamente relacionada con la supervivencia global, tanto en gliomas de grado II (151 vs 60 meses), grado III (81 versus 19 meses) como en glioblastomas (27 versus 14 meses) (Sanson et al., 2009). El subtipo de astrocitoma grado IV *IDH*-mutado (denominado anteriormente, y citado en la presente tesis como glioblastoma *IDH*-mutado) a menudo se observa en pacientes más jóvenes, suele estar precedido de una lesión precursora y está íntimamente asociado a la hipermetilación de un gran número de *loci* que pertenecen a islas CpG de diversos genes (diferentes del gen *MGMT*), definido como G-CIMP (*Glioma-CpG Island Methylator Phenotype*) (Noushmehr et al., 2010).

El gen *TP53* codifica la proteína supresora de tumores p53, implicada en una gran variedad de procesos que incluyen la inducción de apoptosis en casos de daño celular, el mantenimiento de la estabilidad del genoma, la regulación del metabolismo celular o la inhibición de procesos de angiogénesis. Las vías que afectan a p53 están frecuentemente alteradas en distintas neoplasias, incluyendo los gliomas de alto grado (Zhang et al., 2018). La presencia de mutaciones en *TP53* apoya el diagnóstico de glioma de alto grado, encontrándose más frecuentemente en glioblastomas con lesión precursora que en los de

nueva aparición. Sin embargo, su relación con el pronóstico vital de los enfermos no ha resultado significativa en una gran mayoría de estudios (Hill et al., 2003).

El antígeno Ki-67 se expresa en todas las fases del ciclo celular a excepción de G0. El anticuerpo monoclonal MIB-1 reconoce el antígeno Ki-67 como inmunógeno, por ello, las células que se encuentran en fase G1 y S (fase de síntesis de ADN) van a presentar tinción inmunohistoquímica positiva para MIB-1. Un índice elevado en Ki-67 denota, en general, una alta actividad mitótica que puede correlacionarse con el grado de malignidad. Aunque su elevación puede apoyar el diagnóstico histológico en casos dudosos, su relación con el pronóstico es incierta (Alkhaibary et al., 2019).

Otra de las vías más reconocidas en la genética molecular de los gliomas de alto grado es la que afecta a la activación del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (EGFR). Este receptor transmembrana es una proteína tirosin-quinasa que modula numerosos procesos celulares, entre los que destacan crecimiento, migración y supervivencia. Las alteraciones genéticas de *EGFR* son comunes en los gliomas de alto grado, entre las que destacan las amplificaciones o mutaciones que pueden observarse hasta en un 60% de los casos (Eskilsson et al., 2018). La amplificación *EGFR* es mutuamente excluyente de mutación *TP53*. A pesar de los diversos estudios realizados, no existe consenso sobre el valor pronóstico de la amplificación de este gen (Castañeda et al., 2015; Houillier et al., 2006), por lo que cada vez tiende a utilizarse menos como análisis molecular rutinario en los gliomas de alto grado.

Una de las alteraciones genéticas más frecuentes en el glioblastoma es la pérdida de material genético en el cromosoma 10, ya sea ocurriendo en el cromosoma entero o únicamente en alguno de sus brazos. El gen supresor de tumores *PTEN* (*phosphatase and tensin*) se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (*10q*) y aparece mutado en entre un 20-40% de los glioblastomas de nueva aparición (Knobbe et al., 2002). El rol pronóstico de la delección *10q* en glioblastoma es controvertido (Felsberg et al., 2009).

La codelección *1p/19q*, que implica la pérdida completa del brazo corto del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 19 es patognomónica de oligodendroglioma y está estrechamente asociada con las mutaciones de *IDH*. Su presencia predice la respuesta al tratamiento y confiere mejor pronóstico en oligodendrogliomas anaplásicos (Cairncross et al., 1998). Sin embargo, su determinación no parece de utilidad en glioblastoma (Clark et al., 2013).

Otros factores moleculares, como las mutaciones en el promotor del gen telomerasa transcriptasa inversa (*TERT*; *telomerase reverse transcriptase*) se han descrito en un porcentaje elevado de glioblastomas y se han relacionado con peor pronóstico de forma significativa frente a otros factores pronósticos clínicos y moleculares ya validados (M. Simon et al., 2015). La telomerasa es un enzima implicado en el mantenimiento de los extremos teloméricos, debido a que tiene una región con actividad transcriptasa inversa (codificada por el gen *TERT*) que sirve como molde para sintetizar la repetición telomérica. La expresión de la telomerasa juega un importante papel en la senescencia celular, ya que es normalmente reprimida en las células somáticas postnatales, lo que deriva en un acortamiento

progresivo de los telómeros. Es por ello que las mutaciones del gen *TERT* pueden dar lugar a aumentos en la expresión y actividad de la telomerasa originando procesos de oncogénesis.

Las mutaciones del gen *ATRX* (*Alpha-Thalassemia / mental Retardation syndrome X-linked*) han sido identificadas en multitud de neoplasias y también parecen tener relevancia sobre el mantenimiento de los telómeros, aunque mediante un mecanismo independiente de la telomerasa (Lovejoy et al., 2012). Esta alteración está frecuentemente asociada con tumores que presentan mutación *IDH* y *TP53*. Por ello, su aparición es más común en tumores de origen astrocítico y glioblastomas en los que se ha identificado una lesión precedente, siendo muy infrecuente en el glioblastoma de nueva aparición y en tumores de origen oligodendrogliar. En un estudio prospectivo en el que se analizó una cohorte de pacientes con tumores anaplásicos de origen astrocítico, se comprobó que añadida a la mutación de *IDH*, ser portador de mutación *ATRX* confería un pronóstico mucho mejor (Wiestler et al., 2013).

A.5.4. Modelos pronósticos

Teniendo en cuenta algunos de estos factores, se han desarrollado modelos con la intención de realizar cálculos aproximados de supervivencia. Por ejemplo, Gittleman y colaboradores idearon un nomograma que incluía los siguientes factores: edad, sexo, puntuación en la escala de KPS, grado de resección y estado de metilación del promotor del gen *MGMT*. Tras el análisis de esas variables en dos cohortes de pacientes publicadas en ensayos previos, pretenden calcular la probabilidad de supervivencia a los 6, 12 y 24 meses tras el diagnóstico inicial de glioblastoma (Gittleman et al., 2017). Ha de tenerse en cuenta que los pacientes incluidos en esos ensayos recibieron como mínimo una resección quirúrgica

subtotal y que fueron tratados con radioquimioterapia posteriormente, seguido de TMZ adyuvante. La información sobre la mutación de *IDH* no está disponible, por lo que se asume que los datos obtenidos por el algoritmo son aplicables para glioblastomas *IDH-wildtype*, por su mayor prevalencia. Por ejemplo, podemos estimar que un varón de 60 años, con una puntuación en la escala de KPS de 90, promotor del gen *MGMT* metilado y aparente resección completa en las pruebas postoperatorias tiene una probabilidad de supervivencia del 92, 74 y 41% a los 6, 12, y 24 meses respectivamente. Dicho algoritmo está disponible y puede consultarse online (<http://cancer4.case.edu/rCalculator/rCalculator.html>). Esta herramienta pronóstica ha sido posteriormente validada en una cohorte de pacientes que no eran objeto de estudio de ningún ensayo clínico (Molitoris et al., 2017).

A.6. MANEJO DE LAS RECIDIVAS DE LOS GLIOMAS DE ALTO GRADO

A.6.1. Progresión de la enfermedad y diagnósticos diferenciales

A pesar del beneficio en términos de supervivencia que aporta el tratamiento complementario con radio y quimioterapia, la gran mayoría de los pacientes experimentan la recidiva tumoral en el curso de la enfermedad. Las decisiones terapéuticas en pacientes con gliomas de alto grado recidivados deben ser individualizadas, ya que las opciones terapéuticas disponibles hoy en día suponen regímenes paliativos sin evidencia científica basada en estudios aleatorizados y controlados.

La distinción entre enfermedad recidivante y otros fenómenos, como los cambios en las pruebas de imagen inducidos por la radioterapia, puede ser compleja en la práctica clínica diaria, pero con importantes implicaciones, ya que su incorrecta interpretación puede suponer un riesgo de interrupción prematura del régimen terapéutico.

Existen dos fenómenos similares atribuibles a la radioterapia, con algunas diferencias: pseudoprogresión y radionecrosis. La pseudoprogresión define los cambios subagudos que se producen en la RM tras la fase de tratamiento con radioquimioterapia concomitante que pueden simular imágenes de progresión tumoral, y que, normalmente, ocurren en los primeros tres meses tras la finalización del tratamiento. Por otra parte, el fenómeno de radionecrosis se define como una reacción tisular local más severa, que suele incluir fenómenos de edema y necrosis, con posible efecto masa asociado y de aparición más tardía, típicamente entre los 3 y 12 meses tras completar la radioterapia. Aunque algunos

autores defienden que se trata de entidades separadas, la pseudoprogresión y la necrosis por radiación podrían reflejar dos fenómenos dentro de un mismo *continuum* patológico que supone el daño inducido por la radiación (O'Brien & Colen, 2014). El diagnóstico de pseudoprogresión suele hacerse de forma retrospectiva, ya que este cuadro es normalmente autolimitado, con mejora o estabilización de los hallazgos radiológicos mientras se continúa con la pauta de TMZ adyuvante (Brandsma et al., 2008). Por contra, el diagnóstico de radionecrosis suele ser histopatológico. Este cuadro presenta una naturaleza más permanente, con hallazgos microscópicos de desmielinización, anomalías vasculares y necrosis tisular (Siu et al., 2012).

La incidencia de pseudoprogresión varía ampliamente en las distintas series retrospectivas entre un 15-50%, probablemente debido a la diferencia de criterios utilizados (Taal et al., 2008). Ningún hallazgo clínico o imagenológico puede distinguir la progresión tumoral de la pseudoprogresión, pero existen algunos aspectos a tener en cuenta:

- La pseudoprogresión suele ser asintomática mientras que la progresión verdadera se acompaña de empeoramiento clínico con mayor frecuencia.
- Los tumores con metilación del gen *MGMT* se asocian más frecuentemente a fenómenos de pseudoprogresión frente a aquellos no metilados, en los que la progresión precoz es más frecuente.
- Algunas pruebas de imagen especializadas como la espectroscopia por RM, imágenes de RM-perfusión o PET pueden apoyar la discriminación de ambos escenarios.

En general, los cambios en la neuroimagen sugestivos de progresión que se producen en las primeras semanas tras completar el régimen con radioterapia y TMZ concomitante suponen en la mayoría de los casos fenómenos de pseudoprogresión, por lo que se recomienda continuar con el tratamiento indicado, a no ser que exista evidencia de deterioro neurológico o empeoramiento radiológico en las RM sucesivas.

La toma de decisiones en el manejo terapéutico del paciente requiere la evaluación de la respuesta al tratamiento en las pruebas de imagen de seguimiento. Tradicionalmente, se han utilizado los criterios de McDonald, que se basan fundamentalmente en la medición de nuevas áreas de captación de contraste (Macdonald et al., 1990). En la actualidad, el grupo de trabajo de la RANO “*Response Assessment in Neuro-Oncology*” ha revisado y unificado criterios radiológicos que evalúan otros aspectos adicionales, como el incremento de la alteración de señal en secuencias T2 o los fenómenos de pseudoprogresión (Wen et al., 2010). Al estudiar únicamente las captaciones de contraste existe una baja sensibilidad y especificidad para evaluar la respuesta al tratamiento, ya que, por ejemplo, el tratamiento con bevacizumab puede producir una rápida disminución de las lesiones captantes en los primeros días tras el tratamiento. Este fenómeno suele obedecer más a procesos relacionados con la disminución de la permeabilidad vascular que a un verdadero efecto antitumoral y se denomina pseudorespuesta. De igual modo, está descrito que el tratamiento con antiangiogénicos favorece el crecimiento del componente tumoral no captante de contraste, evidente en secuencias T2 y FLAIR.

En la actualidad no existe evidencia científica para determinar la frecuencia en la que se deben realizar las RM en el seguimiento de los pacientes. Las guías de la NCCN recomiendan practicar las pruebas de control tras cuatro semanas a partir del fin de la

quimioradioterapia concomitante y cada tres meses aproximadamente en los primeros años, pudiendo aumentar el intervalo posteriormente si la enfermedad permanece estable.

A.6.2. Generalidades sobre el tratamiento de las recidivas

Cuando se presenta la recidiva tumoral en estos pacientes, el pronóstico a corto plazo suele ser limitado, con índices de supervivencia tras la progresión (en este trabajo se denominará PPS; por sus siglas en inglés, *post-progression survival*) inferiores por lo general a 12 meses en pacientes con glioblastoma (Barker et al., 1998; Ringel et al., 2016; van Linde et al., 2017). Las diferentes alternativas, aunque pueden beneficiar a pacientes seleccionados, se consideran tratamientos paliativos que no están exentos de riesgos y efectos secundarios. Debido a que no existe comparación entre los diversos métodos en ensayos clínicos aleatorizados y controlados, la decisión debe ser individualizada y guiada por datos como las puntuaciones en las escalas funcionales de KPS o ECOG, el intervalo libre de progresión o el patrón radiológico de la recurrencia (local versus difuso o multifocal).

Así, los pacientes con buen estado funcional, pueden ser candidatos a recibir terapias adicionales en la recidiva, entre las que destacan la reintervención, la re-irradiación, la quimioterapia sistémica, el tratamiento con campos eléctricos alternantes de baja intensidad (TTFs) y, por último, terapias experimentales que todavía se sitúan en el ámbito de los ensayos clínicos.

En cambio, los pacientes con puntuaciones bajas en las escalas KPS o ECOG tienen menos probabilidad de beneficiarse de terapias de segunda línea y mayor riesgo de sufrir efectos secundarios, por lo que, en general, se suele indicar un manejo mediante tratamiento

sintomático exclusivo (se denominará BSC en esta tesis, por sus siglas en inglés *best supportive care*) (Pace et al., 2017).

A.6.3. Reintervención

Parece que los mejores candidatos para una nueva intervención son aquellos pacientes jóvenes con mejor estado funcional, un patrón de recidiva localizado alrededor del lecho quirúrgico del tumor primario y un intervalo libre de progresión de la enfermedad más amplio. La exéresis de lesiones que producen efecto de masa puede disminuir la dependencia de corticoides y mejorar los déficits neurológicos focales. Aun así, en pacientes seleccionados, las segundas intervenciones rara vez proporcionan un control duradero de la enfermedad, por lo que suelen ir acompañadas de quimioterapia sistémica posterior. Se ha estimado que alrededor de un 20-30% de pacientes se consideran candidatos para rescates quirúrgicos (Weller et al., 2017), aunque las indicaciones y el impacto pronóstico no están claramente definidos y han motivado la realización del primer artículo de esta tesis. La PPS de los pacientes tratados con una nueva intervención suele situarse entre los 8 y 12 meses en la mayoría de las series que agrupan pacientes afectados de glioblastoma (van Linde et al., 2017). Los datos pronósticos que hacen referencia específica a la PPS en astrocitomas de grado III proceden de trabajos más antiguos y la sitúan en un rango de entre 12 y 18 meses (Ammirati et al., 1987; Harsh et al., 1987; Landy et al., 1994).

Existen una serie de variables clínicas que se han postulado como factores pronósticos en los pacientes a los que se les ofrece la reintervención y que podrían favorecer la argumentación de esta opción terapéutica. La edad y el estado funcional parecen ser factores

determinantes en la elección de los pacientes, que impactan de forma independiente sobre la supervivencia tras la progresión (Ringel et al., 2016). Otros trabajos han determinado que un intervalo libre de progresión mayor mejora significativamente los datos de supervivencia tras la recidiva (Hervey-Jumper & Berger, 2014). En cambio, algunos autores han focalizado su estudio en el grado de resección de las recidivas tumorales, postulándolo como una de las variables más importantes (Bloch et al., 2012; Oppenlander et al., 2014). Un estudio objetivó que la invasión ependimaria por parte del tumor suponía el factor pronóstico negativo más importante en los pacientes reintervenidos, con independencia del estado funcional y del grado de resección (C. K. Park et al., 2013). Se ha demostrado asimismo la utilidad del uso de asistentes quirúrgicos en el tratamiento de las recidivas, como la RMi o la fluorescencia que proporciona el 5-ALA (Broekx et al., 2020).

Pese a todo, no existe evidencia científica para sugerir que deban esperarse mejores resultados con reintervenciones frente a la re-irradiación o tratamientos sistémicos en monoterapia.

A.6.4. Reirradiación

El papel de la reirradiación en las recidivas de gliomas de alto grado no está claro y la mayoría de los estudios hasta la fecha son de naturaleza retrospectiva. Los pacientes con buen estado funcional que presentan recidivas de pequeño tamaño podrían beneficiarse de radioterapia adicional administrada con técnicas de alta precisión, pero con dosis de cobertura total menor, que oscilan entre 30 y 35 Gy repartidas entre 5 y 15 fracciones (Arvold et al., 2017; Straube et al., 2019). La reirradiación no debería ser considerada como tratamiento

único, sino como complemento de un abordaje multimodal en los que se incluya la reintervención y la administración de antineoplásicos, cuando sea posible.

El segundo curso de radioterapia puede combinarse con la administración simultánea de bevacizumab. Estudios aleatorizados han comparado el uso concomitante de ambas modalidades terapéuticas frente a bevacizumab en monoterapia en pacientes con progresión de la enfermedad, encontrando mejorías en los intervalos libres de progresión sin diferencias en la supervivencia global (Tsien et al., 2019).

La radiocirugía estereotáctica fraccionada añadida al bevacizumab parece arrojar los mismos resultados al compararla con antiangiogénicos en monoterapia, según un pequeño estudio aleatorizado que analizó pacientes con recidivas de gliomas de alto grado que presentaron progresión mientras estaban en tratamiento con bevacizumab (Bergman et al., 2020). La radiocirugía estereotáctica de dosis única se estudió en el pasado, pero generalmente está siendo reemplazada por la administración fraccionada, debido al alto riesgo de radionecrosis.

La braquiterapia intersticial consiste en la colocación de “semillas” que contienen fuentes de radiación o radioisótopos líquidos en áreas tumorales o en cavidades postquirúrgicas tras la intervención o través de catéteres. Aunque algunos trabajos sugirieron un discreto beneficio en términos de supervivencia tanto en glioblastomas de nueva aparición como en recidivados (Chan et al., 2005), su uso cada vez es más limitado debido a las altas tasas de radionecrosis y a los avances técnicos de la radioterapia convencional y la radiocirugía.

A.6.5. Quimioterapia

La elección del antineoplásico más eficaz sigue siendo motivo de debate en la actualidad y objeto de estudios de numerosos ensayos clínicos. Los quimioterápicos más utilizados en la recurrencia son el bevacizumab, las nitrosureas o de nuevo la TMZ. Todas estas terapias son consideradas paliativas y ningún fármaco ha sido comparado de forma aleatorizada con el tratamiento sintomático. Igualmente, ningún fármaco ha demostrado ser superior a otros en términos de supervivencia. Por ello, la decisión suele ser individualizada en base a factores como la respuesta a tratamientos previos, tamaño del tumor, edema asociado, necesidad de corticoides y perfil de metilación del promotor del gen *MGMT*.

Como se describió en el apartado anterior, el bevacizumab no se emplea como tratamiento de primera línea por la ausencia de efectos positivos sobre la supervivencia global. Su eficacia en la recidiva de los gliomas de alto grado es también limitada; aunque produce tasas de respuesta radiológica en el 30-40% de los pacientes y puede disminuir la prescripción de esteroides, no mejora los datos en relación con la supervivencia global. Se ha estudiado la combinación de bevacizumab y lomustina en comparación con este último fármaco en monoterapia en un ensayo aleatorizado con gran cantidad de pacientes, observándose mejores tasas de respuesta radiológica y un discreto beneficio en el intervalo libre de progresión, pero sin ningún tipo de diferencia en la supervivencia global (Wick et al., 2017). Resultados similares se obtuvieron al comparar bevacizumab en monoterapia frente a la combinación con irinotecan (Friedman et al., 2009). Aunque los estudios en este ámbito son limitados, en los pacientes con buen estado clínico que presentan progresión de la enfermedad mientras son siendo tratados con bevacizumab en monoterapia, muchos expertos

recomiendan añadir algún agente citotóxico. Por el contrario, si el paciente ya estaba bajo un régimen combinado, se acepta en general continuar con antiangiogénicos y cambiar el fármaco citotóxico por otro con un mecanismo de acción diferente.

La dosis más comúnmente utilizada es la de 10mg/kg con administración quincenal; dosis mayores no han demostrado ser mejores en estudios observacionales (Blumenthal et al., 2016) e incluso dosis menores pueden ser mejor toleradas con efectos similares en la supervivencia. El bevacizumab está asociado con un amplio espectro de toxicidades a nivel cardiovascular (hipertensión, tromboembolismo o disfunción ventricular) así como de otro tipo (proteinuria, problemas en la cicatrización de heridas y mayores tasas de sangrado intracraneal). Estos efectos adversos deben tenerse en cuenta si se plantea la reintervención o en pacientes que reciben anticoagulantes (Norden et al., 2012).

Las nitrosureas (lomustina, fotemustina) fueron tratamientos de primera línea antes de la aparición de la temozolamida, y, hoy en día, pueden ser opciones razonables en pacientes con progresión de la enfermedad que han recibido previamente este fármaco. Se ha estudiado su eficacia como agentes en monoterapia o en combinación con bevacizumab (Lombardi et al., 2014). Sin embargo, los estudios prospectivos con fotemustina muestran, que, aunque son seguros, sus resultados son limitados en relación con la respuesta radiológica en las pruebas de imagen y con los intervalos libres de progresión (Fabrini et al., 2009).

El uso iterativo de temozolamida en la recidiva ha sido contemplado en diferentes estudios que planteaban diversos esquemas de tratamiento con resultados contradictorios. Parece que los pacientes con un intervalo más largo desde la finalización del régimen de

Stupp o con metilación del promotor del gen *MGMT* podrían ser los más beneficiados, siendo la dosis utilizada mucho menos significativa (Weller et al., 2015).

A.6.6. Terapias dirigidas al genotipo

Cada vez existe mayor interés en la secuenciación genética de las muestras enviadas para el análisis anatomopatológico, ya que un número creciente de alteraciones o fusiones genéticas están siendo identificadas como mutaciones conductoras que confieren a la célula una ventaja de crecimiento fundamental para su transformación neoplásica. Esta área de conocimiento se aplica en una gran variedad de neoplasias, incluyendo gliomas. La principal indicación de realizar el análisis genético en el momento actual es la búsqueda de posibles candidatos para ensayos clínicos con nuevos fármacos, aunque, una minoría de pacientes pueden ser identificados como posibles beneficiarios de terapias ya aprobadas. Así, por ejemplo, fusiones genéticas que implican a uno de los receptores neurotróficos tirosina-quinasa (*NTRK*) pueden inducir la aparición de oncoproteínas que impulsan la señalización y el crecimiento tumoral. Se ha descrito que la prevalencia estimada de este tipo de fusiones en glioblastoma es del 1-2 %, y cerca del 40% en gliomas de alto grado en menores de 3 años (Cocco et al., 2018). Existen dos terapias (larotrectinib y entrectinib) cuyo mecanismo de acción es la inhibición selectiva de esta oncoproteína y que han recibido la aprobación para su uso en pacientes con tumores que presentan este tipo de fusión oncogénica, con resultados prometedores (Ziegler et al., 2018).

En una minoría de casos, los glioblastomas presentan mutaciones en genes frecuentemente implicados en la oncogénesis de otro tipo de neoplasias, como por ejemplo la

BRAF V600E. Dichas alteraciones pueden ser identificadas cada vez con más facilidad debido a los avances en medicina molecular, y los pacientes que las presentan, ser candidatos a nuevas terapias específicas dirigidas al genotipo (Lim-Fat et al., 2021).

Se recomienda, por tanto, el uso de paneles de secuenciación genética en los gliomas que han progresado o recidivado con la terapia estándar para valorar posibles alternativas terapéuticas más específicas. Además, es muy probable que la caracterización genética se extienda en los próximos años a los gliomas de nueva aparición y que la clasificación anatomopatológica y los tratamientos se refinen en base a ella.

A.6.7. Tumor Treating Fields

La terapia con campo de tumores (TTFs) constituye otra opción terapéutica en el seno del glioblastoma recidivado en los EEUU. Un estudio aleatorizado que comparó los TTFs frente al régimen quimioterapéutico elegido por el oncólogo mostró cifras similares de supervivencia global o de intervalo libre de progresión en recidiva de glioblastoma, con menor toxicidad hematológica en el brazo de tratamiento con TTFs (Stupp et al., 2012). Ya se comentó con anterioridad la discreta ventaja terapéutica que proporciona su adición al tratamiento estándar en el glioblastoma de nueva aparición (Stupp et al., 2017). Es por ello que las guías de la NCCN incluyen a los TTFs como opción terapéutica en ambos casos (Guías clínicas de la NCCN, www.nccn.org; 2021).

A.6.8. Inmunoterapia

La experiencia con inmunoterapia en la recurrencia de los gliomas de alto grado sólo ha demostrado resultados modestos al compararla con los regímenes tradicionales. El mayor estudio hasta la fecha confrontó el uso de bevacizumab frente al anticuerpo monoclonal nivolumab, que se une al receptor de muerte programada tipo 1 (PD-1) de los linfocitos T. Las células neoplásicas expresan el receptor de superficie PDL1 (ligando de PD1) que, al unirse al receptor PD1 del linfocito T evitan su acción lítica sobre la célula tumoral e inducen su paso a linfocito anérgico, evitando la destrucción de células cancerosas por parte de los linfocitos. En el estudio, los pacientes que presentaban recidiva de su proceso de base, eran asignados aleatoriamente a uno de los grupos, sin encontrarse diferencias de ningún tipo en la supervivencia global y menores tasas de respuesta radiológica en el brazo de tratamiento con inmunoterapia (Reardon et al., 2020). Se ha sugerido que el tratamiento previo a la reintervención en recidiva de glioblastoma con otro anticuerpo monoclonal de mecanismo de acción similar, el pembrolizumab, podría mejorar las cifras de supervivencia (Cloughesy et al., 2019). La administración combinada de varios anticuerpos monoclonales, de inmunoterapia y bevacizumab, o de radiocirugía estereotáctica hipofraccionada sumada a estos, ha sido recientemente descrita en ensayos clínicos de fase I (Sahebjam et al., 2021), con resultados también modestos.

Anticuerpos monoclonales con mecanismos de acción diferentes han sido asimismo testados; el fármaco depatuxizumab-mafodotin es un anticuerpo que bloquea el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (EGFR) conjugado con un potente inhibidor de la tubulina, estructura fundamental de los microtúbulos, necesarios en los procesos de división

celular. El mecanismo de acción reside en que el fármaco actuaría selectivamente sobre células que expresan el receptor EGFR, internalizándose e inhibiendo a estos componentes del citoesqueleto. La adición de depatuxizumab-mafodotin a la TMZ en pacientes con recidiva de glioblastoma que presentan amplificación del gen *EGFR*, podría estar asociada con un beneficio modesto en términos de supervivencia (van den Bent et al., 2020). Dichos hallazgos no se han reproducido al incluir a este anticuerpo en el tratamiento del glioblastoma de nueva aparición.

Otras estrategias en relación con vectores víricos han sido testadas en recidivas de gliomas de alto grado con resultados también discretos. Un estudio reciente comparó el tratamiento de terapias basadas en vectores con quimioterapias de segunda línea, obteniendo una equidad en los datos de supervivencia. El fármaco Vocimagene amiretrorepvec es un vector replicativo procedente de un retrovirus diseñado para liberarse en la cavidad quirúrgica tras la cirugía de rescate en gliomas de alto grado, y replicarse de forma selectiva en las células en proceso de división (células tumorales del margen del lecho quirúrgico y células inflamatorias). El mecanismo de acción del vector reside en la capacidad, mediante el enzima citosina desaminasa, de convertir la 5-fluorocitosina en 5-fluoroacilo, que tiene conocidas propiedades antineoplásicas. A diferencia de la 5-fluorocitosina, el 5-fluoroacilo no atraviesa bien la barrera hemato-encefálica, por lo que la terapia con vectores se complementa con la administración sistémica de 5-fluorocitosina, que va a ser convertida a 5-fluoroacilo únicamente en aquellas células infectadas con el vector, sin los efectos adversos a nivel sistémico (Cloughesy et al., 2020).

A.6.9. Terapia térmica intersticial con láser

Esta modalidad terapéutica guiada por RM (LITT; *laser intersticial thermal therapy*) podría ser una estrategia en pacientes que presenten recidivas de gliomas de alto grado en áreas no accesibles mediante craneotomía, o que no sean candidatos a una nueva intervención. El procedimiento consiste en la introducción de un haz de fibra óptica en el área a tratar y la producción de una lesión térmica con el objetivo de dañar las células tumorales. No existen estudios aleatorizados que apoyen el uso de LITT frente a otras técnicas, pero parece ser una terapia segura y con eficacia similar a los planteamientos tradicionales en recidivas de glioblastoma (Kamath et al., 2019).

A.6.10. Tratamiento sintomático

El tratamiento de soporte (BSC; *best supportive care*) es asimismo muy importante en el manejo de estos pacientes, ya sean o no candidatos a recibir terapias de segunda línea. Muchos de ellos precisan corticoesteroides y fármacos antiepilépticos para el manejo del edema peritumoral y las crisis comiciales, con la consecuente aparición de toxicidad y efectos secundarios, particularmente en sujetos de edad avanzada. Los pacientes que presentan un mal estado funcional, incluyendo a aquellos que son totalmente dependientes, se manejan exclusivamente con tratamiento de soporte. El tratamiento paliativo en estos pacientes debe abordar el manejo de aspectos comunes a otras enfermedades en estadio avanzado, como la incontinencia urinaria, el síndrome confusional o el mayor riesgo de caídas. La EANO (*European Association for Neuro-Oncology*) realiza una revisión exhaustiva sobre los aspectos más importantes en relación al tratamiento de los síntomas más frecuentes, las

necesidades del paciente y de su cuidador y los matices terapéuticos específicos de la fase terminal (Pace et al., 2017) .

A.6.11. Algoritmos terapéuticos

Tras su revisión, podemos observar que en las recidivas de gliomas de alto grado existen múltiples opciones terapéuticas sin que ninguna haya demostrado una clara superioridad. Por ello, se han desarrollado guías de manejo publicadas por la NCCN (figura 6) y la EANO, que podrían ayudar al facultativo en la decisión terapéutica.

Las guías de la NCCN recomiendan, cuando sea posible, la inclusión de pacientes dentro de un ensayo clínico. Si no esto no es factible o el paciente no acepta la inclusión, entonces la decisión será individualizada y tendrá en cuenta diversos factores: preferencias del enfermo, respuesta a tratamientos previos recibidos, estado funcional y calidad de vida. En caso de buen estado funcional del paciente, el patrón de recurrencia podría ser determinante en la elección del tratamiento. Los pacientes con recurrencias locales en los que se crea factible una resección total de la lesión, pueden considerarse como buenos candidatos a nuevas intervenciones, generalmente seguidas de quimioterapias de segunda línea. Si la resección total no es factible, se contemplan las opciones de tratamientos sistémicos directamente, re-irradiación o TTFs. Los pacientes con buen estado clínico que presentan recidivas difusas o multifocales no son tributarios de iniciar tratamientos más adecuados para recurrencias locales, y suelen recibir nuevos esquemas de terapia sistémica.

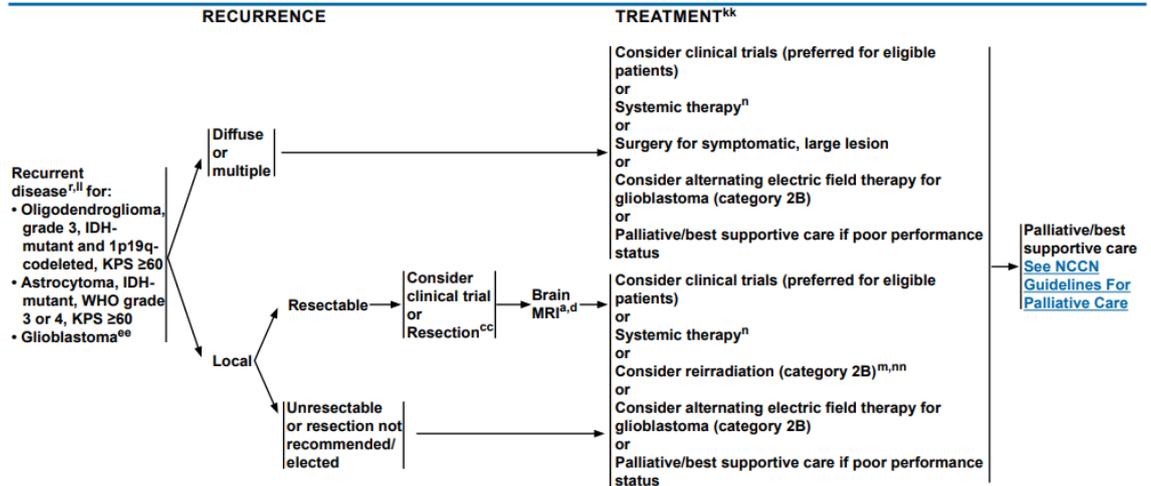


Figura 9. Algoritmo terapéutico en el manejo de las recidivas de gliomas de alto grado revisado por la NCCN en 2022 (www.nccn.org). Los autores realizan una primera distinción en función de si la recidiva es difusa o local. La reintervención se contempla en el seno de recidivas de tipo local (o exéresis de la lesión voluminosa y sintomática en el caso de recidivas múltiples) y lesiones quirúrgicamente resecables teniendo en cuenta la preservación de la función neurológica. En el resto de escenarios, se ofrecen como alternativas la inclusión en algún ensayo clínico, la terapia sistémica y la terapia de campo de tumores (sólo en glioblastoma y con nivel de evidencia IIB). Con independencia del tipo de recidiva, en los pacientes que presentan un deterioro clínico, se recomienda el tratamiento sintomático.

La figura 10 representa el algoritmo terapéutico desarrollado por la Sociedad de Neuro-oncología (SNO, *Society for Neuro-Oncology*) y la EANO con aplicación en las recidivas de glioblastoma (Wen et al., 2020). Su análisis revela que no difiere mucho de las guías de consenso de la NCCN, ya que se motiva la inclusión en ensayos clínicos de todos los pacientes que puedan participar. La variable más determinante en este caso es la puntuación obtenida en escalas funcionales: si ésta es baja; se recomienda tratamiento sintomático exclusivo (BSC) a no ser que el deterioro se sospeche causado por edema peritumoral o toxicidades en relación con la corticoterapia, en cuyo caso podría iniciarse el tratamiento con antiangiogénicos. Si el paciente goza de un buen estado clínico, puede plantearse la

reintervención con el objetivo de alivio sintomático. Si una nueva operación no está indicada y la enfermedad recidivante se sitúa fuera de los márgenes radiados inicialmente, es lógico aplicar radioterapia en la recaída con tratamiento sistémico posterior. Si por el contrario se trata de recidivas que asientan sobre áreas cerebrales previamente radiadas, podría contemplarse la reirradiación en casos muy concretos. En función del estado de metilación del promotor de *MGMT*, el tipo de tratamiento sistémico en la recidiva puede variar; en los casos con hipermetilación puede utilizarse TMZ o nitrosureas en combinación con antiangiogénicos (nivel de evidencia IIb), mientras que en tumores con ausencia del promotor de *MGMT* metilado se contempla únicamente el uso de bevacizumab.

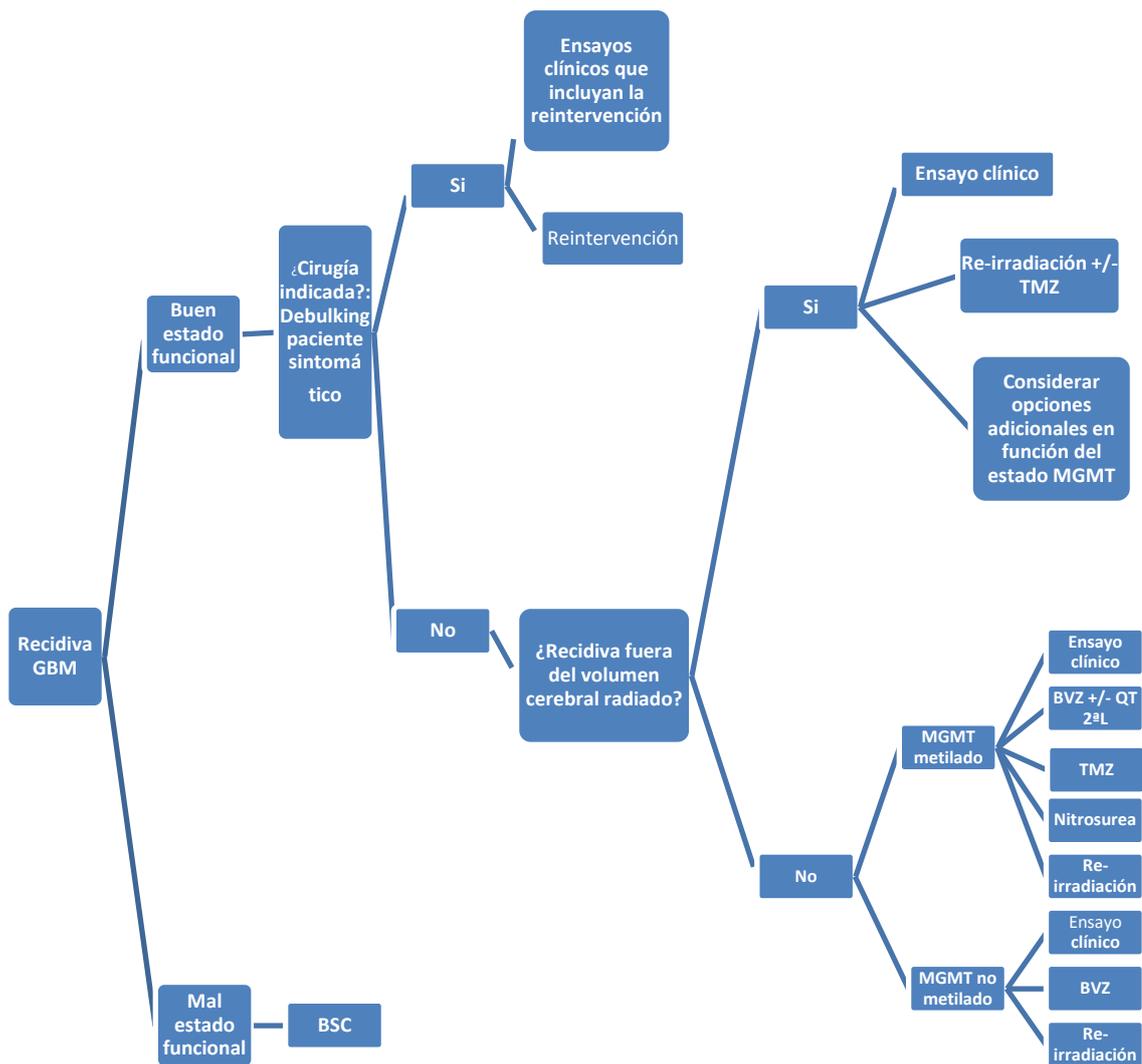


Figura 10. Algoritmo terapéutico elaborado por la SNO y la EANO en recidiva de glioblastoma. Adpatado de Wen et al. (Wen et al., 2020). Leyenda: GBM: glioblastoma, TMZ: temozolamida, BSC: tratamiento sintomático, BVZ: bevacizumab, QT 2ªL: quimioterapias de 2ª línea.

B. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS

MOLECULARES EN RELACIÓN CON EL

GEN *MGMT* EN PACIENTES

REINTERVENIDOS DE GLIOMAS DE ALTO

GRADO

B.1. PRINCIPIOS DE LA EPIGENÉTICA

B.1.1. Definición de epigenética

Podemos definir los cambios epigenéticos como aquellos que alteran la expresión genética sin producir cambios en la secuencia primaria del ADN. Estos cambios influyen sobre un amplio rango de aspectos en relación con el desarrollo normal, la fisiopatología de algunas enfermedades y son objeto de estudio para el diseño de nuevas terapias en oncología.

Para entender mejor la epigenética, debemos recordar que todas las células nucleadas en nuestro organismo comparten la misma secuencia de ADN, en la que se incluye la totalidad del genoma, que presenta regiones codificantes y no codificantes. A pesar de que todas las células tienen el mismo código genético, estas presentan comportamientos muy diferentes en función del tejido en el que se hallan o la función que desempeñan. Dichas diferencias no se explican por variaciones en el genoma, sino por niveles adicionales de regulación, que hacen que la célula tenga un determinado fenotipo. La regulación epigenética puede incrementar o disminuir la expresión de determinados genes sin alterar su secuencia y de ese modo contribuir a crear fenotipos específicos.

La epigenética se define, por tanto, como el estudio de los cambios que se producen en la cromatina o en el ADN sin afectar a su secuencia primaria. El epigenoma se puede definir como el conjunto de cambios epigenéticos que presentan las células de un organismo; diferenciándose del genoma en que el epigenoma puede ser diferente de una célula a otra. Aunque ambos pueden tener un carácter hereditario, sólo el epigenoma puede sufrir procesos

de reprogramación, como ocurre en estados normales del desarrollo, en enfermedades adquiridas o en respuesta a exposiciones ambientales o farmacológicas (Feinberg, 2018).

Las modificaciones epigenéticas son, por tanto, cambios bioquímicos en la molécula de ADN, en las proteínas acompañantes (histonas) o en la cromatina, con carácter reversible y que no alteran la secuencia genómica. La adición o sustracción de un grupo metilo o acetilo a una base nitrogenada de la molécula de ADN o a una histona constituye un ejemplo típico de cambio epigenético, que puede facilitar o dificultar la interacción física entre el ADN y diferentes moléculas como factores de transcripción, ADN polimerasas u otros agentes. Por tanto, la regulación epigenética implica la variabilidad que puede existir en la expresión de genes determinada por estas modificaciones. Cuando las modificaciones se establecen directamente sobre la cadena de ADN, suelen estar localizadas en las regiones promotoras o amplificadores de un determinado gen; por el contrario, si están localizadas en las histonas, determinan principalmente cuán compactada esta la cadena de ADN sobre éstas, afectando al acceso e interacción con factores de transcripción y otras moléculas.

B.1.2. Regulación epigenética

El silenciamiento genético es un término que define la reducción o la completa supresión de la expresión de un gen y los mecanismos epigenéticos son responsables de este acontecimiento en algunos casos con gran implicación en la práctica clínica. La epigenética engloba además la impronta genómica, un sistema de regulación de la expresión génica, presente en especies de gestación intrauterina, que consiste en marcar diferencialmente, mediante modificaciones epigenéticas, determinados genes en función de su origen parental,

de manera que sólo se expresa el alelo materno o paterno (Hunter, 2007). Considerando el comportamiento diferencial de alelo de estos genes, la impronta genómica es, junto con los caracteres ligados a los cromosomas sexuales y a los genes mitocondriales, una de las excepciones al principio mendeliano básico de equivalencia, el cual describe la inexistencia de diferencias en el comportamiento de los genes de origen paterno y materno.

La regulación epigenética podría ser considerada, por tanto, como un nivel adicional de regulación genética sobre la secuencia primaria de ADN, con una naturaleza más maleable y mayor potencial de cambio. Existen dos grandes tipos de modificaciones en términos generales, aquellas que modifican directamente el ADN (metilación de ADN) y otras que afectan a las proteínas de unión al ADN (histonas). Además, estos cambios pueden afectar a áreas determinadas alrededor de un gen o implicar regiones de cromatina mucho más extensas.

B.1.3. Marcas epigenéticas

En la metilación del ADN, los grupos metilo pueden ser añadidos o sustraídos, hecho que normalmente acontece en las regiones promotoras o amplificadoras de un determinado gen. Por lo general, en mamíferos, la metilación consiste en la agregación de un grupo metilo (CH_3) a una base de citosina para crear 5-metilcitosina (m^5C) (veremos con posterioridad que el enzima MGMT, objeto de estudio del segundo trabajo de esta tesis, no reconoce los residuos metilados de citosina; sino los de guanina en su posición O^6). Algunas proteínas reguladoras de la cromatina pueden unirse a estos residuos metilados, reduciendo el acceso de la maquinaria molecular implicada en la transcripción genética y dificultando por tanto su acción. Como resultado, se puede concluir que, en general, la metilación del ADN en las

regiones promotoras de un gen previene la transcripción y puede producir un silenciamiento genético. La metilación del ADN supone la marca epigenética más útil debido a que puede permanecer estable durante décadas en muestras fijadas con formol e incluidas en parafina (Thirlwell et al., 2010).

Los enzimas encargados de catalizar la metilación del ADN se denominan ADN metiltransferasas. Existen diversos tipos con función diferente; algunas son responsables de la creación de nuevos residuos metilados mientras que otras actúan ayudando en la replicación del ADN en la fase S del ciclo celular, manteniendo la simetría del perfil de metilación en la nueva hebra de ADN sintetizada y facilitando la heredabilidad de los cambios epigenéticos (Vineis et al., 2017).

En contraste, la hipometilación del ADN implica la eliminación de residuos metilo de las bases de citosina y suele conllevar a la expresión de un gen previamente silenciado. La falta de metilación va a inducir una configuración de la cromatina que facilita el proceso de transcripción. El término hipometilación suele sustituir al de desmetilación, ya que siempre suelen encontrarse algunos residuos metilados. El proceso de extracción de residuos metilo del ADN involucra diversos pasos catalizados por enzimas denominadas metilcitosina dioxigenasas.

Las histonas son proteínas habitualmente representadas en forma de disco sobre las que la cadena de ADN se envuelve para crear un nucleosoma. Este es el primer paso de compactación necesario para condensar el ADN lineal en cromosomas. Existen diferentes modificaciones que afectan a las histonas, entre las que destacan la agregación de grupos metilo (CH^3) o acetilo (CH^3CO) a aminoácidos de lisina que se encuentran en zonas terminales de la proteína. Las modificaciones de las histonas pueden alterar la afinidad de

ésta por el ADN o activar el reclutamiento de otras proteínas que afectan al grado de compactación de la cromatina (Strahl & Allis, 2000). Las consecuencias de las alteraciones epigenéticas de las histonas sobre la transcripción son variables y dependen del tipo de cambio y la posición afectada. Su denominación se especifica según la subunidad de la histona implicada, el aminoácido alterado y la clase de mutación. Así, por ejemplo, las modificaciones sobre la histona subunidad 3 lisina 27, asociadas con silenciamiento genético, están implicadas en la génesis del glioma difuso de línea media (H3K27M).

La cromatina es una estructura compleja formada por ADN, ARN, histonas y diversas proteínas reguladoras. Existen dos tipos bien diferenciados; la heterocromatina y la eucromatina. La primera es compacta, silente a nivel transcripcional e inaccesible para factores de transcripción y otras moléculas, mientras que la eucromatina es transcripcionalmente activa, con nucleosomas más espaciados y accesible a la maquinaria transcripcional. Los cambios epigenéticos pueden afectar incluso a estas áreas topográficas más extensas, influyendo sobre la expresión simultánea de diversos genes (Feinberg, 2018). Aunque son mucho menos conocidas, se ha demostrado este tipo de reorganización en procesos de diferenciación celular (transformación de células madre en células tisulares especializadas) y en algunos tipos de tumores.

B.1.4. Procesos regulados por cambios epigenéticos

Como se comentó con anterioridad, a diferencia de la información genética (que es constante en cada célula del organismo a lo largo de la vida), las marcas epigenéticas tienen una gran plasticidad y pueden cambiar dependiendo del tipo de célula y del estado del

desarrollo. Es por ello que la regulación epigenética está implicada en multitud de procesos fisiológicos; entre los que podemos destacar la diferenciación y la programación celular que se produce desde células madre pluripotenciales a diferentes células tisulares; la inactivación de un cromosoma X en las células somáticas de las mujeres (Vallot et al., 2016) o los cambios adaptativos en respuesta a factores ambientales; como la ingesta calórica, el estrés o la exposición a toxinas (Vineis et al., 2017).

Con referencia específica al SNC, los procesos de metilación del ADN son esenciales para los procesos de maduración neuronal y la diferenciación de las diversas células gliales. Además, estudios en neuronas postmitóticas han revelado que la actividad neuronal induce tanto procesos de metilación como de desmetilación, afectando a su vez a la transcripción de diversos genes que están implicados en procesos tan importantes como el aprendizaje o la memoria (Moore et al., 2013).

Por otro lado, cada vez existe mayor evidencia de que algunas enfermedades del desarrollo o adquiridas están ligadas a alteraciones epigenéticas. Mutaciones que afectan a un subtipo de metiltransferasa o alteraciones en proteínas que reconocen específicamente residuos metilados son la causa de síndromes raros tales como la enfermedad de Rett o la neuropatía sensorial y autonómica tipo 1 (HSAN1). Por otro lado, la metilación anómala de algunos genes puede tener consecuencias drásticas en el neurodesarrollo, ya que constituye la base fisiopatológica de algunas entidades como los síndromes de Prader-Willi, Angelman o del cromosoma X frágil (Moore et al., 2013).

Los patrones de metilación del ADN pueden verse también modulados por cambios en el microambiente del sistema nervioso central. La estimulación eléctrica repetida se ha

utilizado en modelos animales para investigar si las crisis epilépticas recurrentes podrían producir modificaciones del epigenoma, con hallazgos posteriores de extensos cambios en el perfil de metilación del ADN (Guo et al., 2011). De igual modo, el consumo periódico de cocaína parece modular la expresión de un subtipo de metiltransferasa en el núcleo accumbens, produciendo cambios en patrón de metilación (Laplant et al., 2010).

B.1.5. La epigenética en oncología

El reconocimiento de que no sólo las bases nitrogenadas de la cadena de ADN son capaces de suprimir o favorecer la expresión de un gen en las células de origen tumoral ha despertado un gran interés en las alteraciones epigenéticas como posibles dianas terapéuticas para la creación de nuevos fármacos. Sin embargo, a día de hoy son pocas las innovaciones terapéuticas que han podido superar las fases de ensayos clínicos y se utilizan en la práctica diaria (Paluch et al., 2016). Aún así, existen algunos fármacos inhibidores de las ADN metiltransferasas (agentes hipometilantes) o inhibidores de la acetilación de las histonas que son utilizados de forma rutinaria en esquemas de tratamiento de enfermedades hematológicas.

Con respecto al área específica de neurooncología, puede precisarse que todas las neoplasias son epigenéticamente anormales y que algunas comparten determinadas alteraciones en el epigenoma. Debido a que las marcas epigenéticas pueden conceder a una célula madre pluripotencial una mayor capacidad de supervivencia y de replicación, es fácil entender como estos mecanismos podrían ser una causa de oncogénesis, otorgando a las células tumorales propiedades tales como la inmadurez, resistencia a procesos de muerte celular programada o alto potencial replicativo. Los cambios en el epigenoma tienen unos

efectos muy variables e incluyen procesos de hipometilación global, hipermetilación de promotores de determinados genes, así como modificaciones en las histonas (Bates, 2020). Algunos autores sugieren que las alteraciones del epigenoma son un mecanismo común compartido por cánceres que derivan de distintos tejidos, y cada uno de ellos se caracteriza por presentar patrones específicos de aberraciones en las marcas epigenéticas, contribuyendo a un determinado comportamiento biológico (Feinberg, 2018).

Los procesos de hipometilación global pueden propiciar la activación de algunos oncogenes. A modo de ejemplo, la hipometilación de oncogenes *RAS* en algunos tumores sólidos fue la primera alteración del epigenoma descrita en oncología (Feinberg & Vogelstein, 1983). La metilación anómala en los promotores de determinados genes puede observarse casi en la totalidad de las neoplasias, con potencial para modificar muchos más genes que las mutaciones genéticas. La hipermetilación de promotores puede inducir un silenciamiento aberrante de genes supresores de tumores, como ocurre, por ejemplo, con el gen *p16* y la aparición de cáncer de colon (Yi et al., 2001).

Adicionalmente, las marcas epigenéticas pueden tener significación de respuesta a la terapéutica o pronóstica en oncología. En relación con los gliomas, las mutaciones del gen que codifica el enzima isocitrato deshidrogenasa (*IDH1* y *IDH2*, claramente vinculadas con mejores datos de supervivencia global; están asociadas con incrementos en la metilación del ADN. Otras marcas epigenéticas ya comentadas en el apartado anterior incluyen las mutaciones de *ATRX* y el fenotipo de metilación G-CIMP (Gusyatiner & Hegi, 2018). Sin embargo, el ejemplo más importante en este ámbito y sobre el que versa el segundo trabajo de esta tesis doctoral es la hipermetilación del promotor del gen *MGMT*, que predice la sensibilidad al tratamiento con alquilantes.

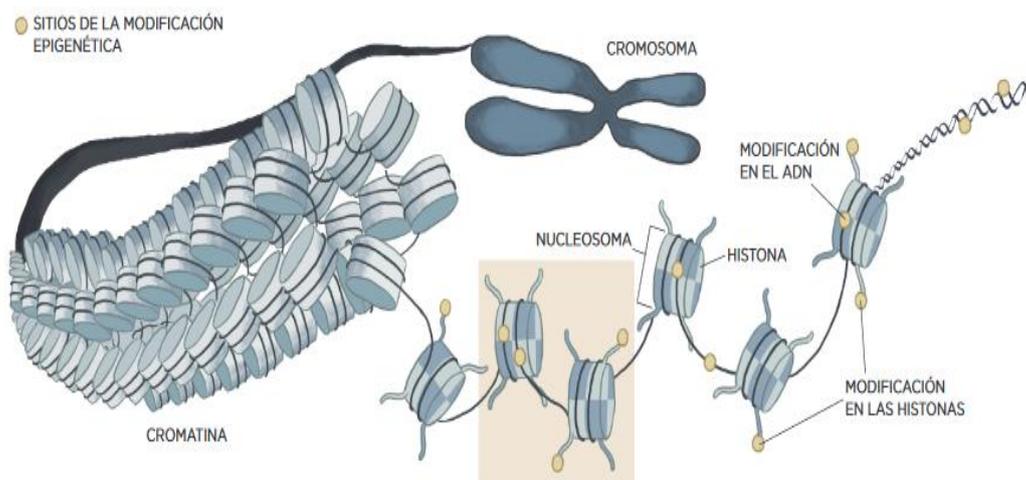


Figura 11. Ilustración que muestra el proceso de compactación del ADN y las marcas epigenéticas. La doble hélice de ADN se agrupa sobre un octámero de histonas para la formación de nucleosomas, que asimismo serán compactados para la creación de cromatina y cromosomas. Las marcas de color amarillo representan los enlaces covalentes presentes sobre la cadena de ADN o las regiones distales de las histonas (marcas epigenéticas). Su presencia altera la unión de la cadena de ADN a factores de transcripción y otros mecanismos reguladores, formando las bases de las modificaciones epigenéticas.

B.2. EL GEN *MGMT*, EL ENZIMA *MGMT* Y SU MECANISMO DE ACCIÓN.

B.2.1. Mecanismos de reparación del ADN

Las células no logran funcionar si existen daños en la cadena de ADN que puedan comprometer la integridad del genoma. Según el tipo de daño, se han desarrollado una variedad de estrategias para restaurar la normalidad. Si es posible, las células utilizan la cadena de ADN complementaria como "plantilla" para restaurar la información original. Si no hay ninguna plantilla disponible, las células utilizan como último recurso un sistema de recuperación más propenso a errores conocido como síntesis de translesión.

Los daños al ADN pueden alterar la configuración espacial de la hélice y esto ser detectado por diferentes moléculas específicas reparadoras, que inducen la adhesión de otras formando un complejo que permite la reparación. La clase de moléculas implicadas y el mecanismo de reparación que se utiliza dependen del tipo de daño y de la fase del ciclo celular en el que se encuentre la célula.

Cuando sólo una de las dos cadenas de la doble hélice tiene un defecto, la otra puede ser utilizada como plantilla para dirigir la corrección de la cadena dañada. Se han descrito diferentes mecanismos (Chatterjee & Walker, 2017):

- Reparación sobre la marcha: Es el principal sistema de corrección de daños. Lo realizan las propias ADN polimerasas gracias a su actividad exonucleasa para corregir un nucleótido equivocado que hayan colocado. El emparejamiento

incorrecto suele causar una distorsión de la doble hélice que las ADN polimerasas tienen capacidad de detectar.

- Reparación directa: Este mecanismo no requiere la eliminación de nucleótidos o bases nitrogenadas, sino que son los enzimas los que reparan directamente las alteraciones nucleotídicas. Los dos ejemplos principales de enzimas implicados incluyen las fotoliasas (separan los dímeros de timinas formados por radiación UV, y las metiltransferasas, que detallaremos a continuación.
- Reparación por escisión de base (BER; *base excision repair*): Consiste en la reparación de daños a un único nucleótido causados por oxidación, alquilación, hidrólisis u otros mecanismos. Dos enzimas van a intervenir en la escisión de la base nitrogenada del nucleótido dañado y del esqueleto residual para ser sustituido finalmente por el nucleótido adecuado por la actividad secuencial de las ADN polimerasa y ligasa.
- Reparación por escisión de nucleótido (NER; *nucleotide excision repair*): Es un mecanismo implicado en la reparación de daños que afectan cadenas más largas y que distorsionan la doble hélice de ADN de forma importante.
- Reparación de malapareamiento (MMR; *mismatch repair*): El único mecanismo correctivo que opera tras la replicación, rectificando errores de nucleótidos mal apareados. Para ello, debe reconocer qué hebra es la correcta, lo que en procariotas ocurre porque el ADN suele tener algunas de sus bases metiladas. Tras la replicación la hebra nueva no se metila hasta comprobar la ausencia de errores, por ello, la maquinaria de reparación supone que si hay un error se habrá producido en la hebra no metilada. Una vez metiladas, o no hay corrección posible, o ésta puede causar errores.

B.2.2. La molécula MGMT: mecanismo de acción y expresión fisiológica

La molécula O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) contiene 207 aminoácidos y funciona como un enzima reparador de la cadena de ADN que ha sido conservado ampliamente durante la evolución de las especies. Su mecanismo básico de acción es revertir el proceso de alquilación (en el que se incluye la metilación) si éste se ubica en la posición O⁶ de un residuo de guanina (O⁶-metilguanina; O⁶-mG); transfiriendo rápidamente el grupo alquilo al espacio activo del enzima en una sola reacción (Pegg, 2000). En menor proporción, puede eliminar otro tipo de residuos como los de O⁶-etilguanina o O⁴-metiltimina (Gerson, 2004). Tras la reparación, la proteína MGMT alquilada se degrada por mecanismos de ubiquitinación (Srivenugopal et al., 1996). La reparación de estas lesiones es esencial para la integridad celular, ya que la ausencia de acción del enzima puede conllevar a la acumulación de mutaciones e inestabilidad cromosómica (Delaney & Essigmann, 2001).

Se han identificado hasta 438 polimorfismos de la molécula MGMT. Suponen modificaciones leves del enzima cuya identificación puede proporcionar en ocasiones información relacionada con la sensibilidad al tratamiento, pronóstico, o riesgo de padecer un determinado tipo de cáncer. El polimorfismo más frecuente es el *Ile143Val*, que genera un enzima de igual capacidad reparadora que la molécula de MGMT original. *Ile143Val* se ha asociado con menor riesgo de padecer cáncer de colon en mujeres y cáncer de cabeza y cuello en la población general; sin embargo, su asociación con neoplasias de pulmón, mama o endometrio es controvertida debido a los resultados discordantes obtenidos en diversos trabajos (Bugni et al., 2007). Existen otros polimorfismos muchos menos frecuentes que presentan asociaciones variables con diferentes tipos de neoplasias y respuestas a

quimioterápicos. Parece que el polimorfismo *Leu84Phe* podría estar vinculado con una mayor incidencia de glioblastoma (Inoue et al., 2003).

Debido a la importancia que tiene el enzima MGMT en la reparación del ADN, se han llevado a cabo numerosos estudios para establecer asociaciones entre la expresión del enzima mediante inmunohistoquímica, carcinogénesis, y metilación del promotor *MGMT* en tejidos normales y tumorales. Debido a su funcionalidad, el enzima MGMT está presente en todos los tejidos humanos con expresión variable. Parece que los niveles de expresión tisular de MGMT son más altos en el hígado, y más bajos en tejidos linfoides, células hematopoyéticas y cerebro (Sharma et al., 2009). Además, según un estudio, es posible que los niveles de actividad del enzima MGMT estén relacionados con la edad gestacional y permanezcan estables en los tejidos a partir de la semana 20 de gestación. Antes de este momento, los niveles de MGMT son más bajos, por lo que la exposición a agentes alquilantes tanto exógenos como endógenos podría resultar en una susceptibilidad incrementada de desarrollo de tumores a posteriori (Bobola et al., 2007).

B.2.3. MGMT y tumorigénesis

Debido que el enzima MGMT repara los residuos mutagénicos de O⁶-mG, la ausencia de función de esta molécula puede producir mutaciones e inestabilidad cromosómica que conlleven la formación de tumores. Existen publicaciones científicas que demuestran que ratones “MGMT-*knockout*” tienen mayor sensibilidad a agentes citotóxicos alquilantes y a procesos de tumorigénesis (Sakumi et al., 1997). El potencial mutagénico de O⁶-mG puede observarse también en el artículo de Becker y colaboradores, en el que se postula a este

residuo como fundamental para la iniciación de tumores dérmicos en ratones *MGMT*-transgénicos (Becker et al., 1996).

La expresión de *MGMT* puede ser también muy heterogénea y tener diversas implicaciones en los tejidos tumorales de distinta estirpe. El silenciamiento epigenético que lleva a la disminución de la expresión de *MGMT* se ha documentado en una gran variedad de tipos de neoplasia. Varios autores han postulado que puede existir una asociación entre la pérdida de expresión de *MGMT* y la transformación maligna de algunas lesiones, como podría ocurrir en el carcinoma escamoso de boca (Sawhney et al., 2007) o en astrocitomas difusos (Nakasu et al., 2007). Sin embargo, el incremento de los niveles de *MGMT* se asocia con otro tipo de lesiones, que incluyen, por ejemplo, el cáncer colorrectal, pancreático o de mama (Soejima et al., 2005). La metilación del promotor del gen *MGMT* se ha intentado asociar al pronóstico de diferentes tipos de tumor con resultados variables. A modo de ejemplo, parece que no existe relación con la supervivencia de los carcinomas hepatocelulares (Herath et al., 2007) y podría ser un marcador de mal pronóstico en los carcinomas pulmonares de tipo no escamoso (Cooper et al., 2008). Este mismo autor encontró que la pérdida de expresión de *MGMT* podría estar influida por el hábito tabáquico.

B.2.4. MGMT y agentes alquilantes

La gran familia de citotóxicos denominados alquilantes empleados en oncología utiliza las vías que implican al enzima *MGMT*, mediando la unión de grupos alquilo a las bases nitrogenadas del ADN, entre otros mecanismos de acción. La presencia de estos añadidos da lugar a un emparejamiento de bases anormal, inhibiendo la división celular y

desembocando en procesos apoptóticos. Aunque la producción de residuos O⁶-alquilguanina no supone la mayor parte de las lesiones generadas por los agentes alquilantes, parece que pueden ser las más citotóxicas. El tratamiento con agentes alquilantes se acompaña de un aumento de residuos O⁶-alquilguanina en el ADN, que tiene mayor afinidad para emparejarse en la fase de replicación con la molécula de timidina en lugar de citosina (como ocurre en el caso de residuos de guanina no metilados). El malapareamiento es reconocido por el sistema MMR, que produce una corrección con una nueva molécula de timidina. Parece que este fenómeno induce diversos intentos fútiles de reparación, con rupturas y activación de señales de daño en la cadena de ADN, que pueden llevar, en algunos casos, a procesos de muerte celular programada (Ochs & Kaina, 2000). No obstante, la existencia de la proteína MGMT permite la reparación de este emparejamiento anormal, rescatando a la célula del daño inducido por los agentes alquilantes al eliminar los residuos metilados, asociándose, por tanto, con mayor resistencia al tratamiento y peor pronóstico. Dicho de otra manera, los gliomas que presentan inactivación del gen *MGMT* (por la hipermetilación de su promotor) son menos capaces de reparar los daños generados en el ADN a causa de los citotóxicos y son, por tanto, más sensibles a la terapia con alquilantes. La primera publicación acerca de este fenómeno data de hace más de dos décadas (Esteller et al., 2000).

Sin embargo, MGMT no es el único mecanismo que puede reparar los agregados en la cadena de ADN producidos por los alquilantes. Tanto el sistema NER como el BER son complejos multienzimáticos implicados en la corrección de daños de diferente envergadura, producidos por entrecruzamientos anormales o por moléculas como la O⁶-etilguanina o N³ o N⁷-metilguanina.

B.2.5. El gen *MGMT*

La molécula *MGMT* es codificada por un único gen de tamaño grande (*MGMT*) localizado en el cromosoma *10q26* que incluye 5 exones, el primero de los cuales es no-codificante (Soejima et al., 2005). Al igual que ocurre con muchos genes constitutivos o “*housekeeping*”, el promotor del gen *MGMT* carece de elementos como la caja TATA o la caja CCAAT, que suelen ser el sitio de unión de los factores de transcripción y contiene una isla CpG. Las islas CpG son regiones genómicas de extensión variable (entre 300 y 3000 pares de bases) que contienen una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos situados comúnmente en la vecindad del lugar dónde se inicia la transcripción.

El promotor del gen *MGMT* se representa de forma esquemática en la figura 12. En ella podemos apreciar que la zona con mayor actividad promotora se encuentra en el extremo 5' del gen desde las posiciones -953 a +202 pares de bases (considerando la posición +1 el lugar de inicio de la transcripción). Contiene una región promotora mínima (-69 a +19), una región amplificadora a la que se unen diferentes proteínas (+143 a +202), zonas sensibles a corticoesteroides y sitios de unión de diversos factores de transcripción, como SP1, AP1 o AP2 (Harris et al., 1994).

La isla CpG del gen *MGMT* está contenida en el promotor (localizada entre la posición -552 y +289 pares de bases) y consta de 97 dinucleótidos CpG que habitualmente se encuentran no metilados en tejidos normales, aunque el patrón de metilación suele estar distorsionado en distintos tipos de neoplasias. La metilación de los CpGs induce la adhesión de diferentes proteínas de unión (*methyl-CpG-binding proteins*) que provocan alteraciones en

la estructura de la cromatina y evitan la unión de factores de transcripción, silenciando de esta manera el gen (Nakagawachi et al., 2003).

Algunos trabajos han estudiado de forma específica las diferencias existentes en los patrones de metilación del promotor *MGMT* entre líneas celulares que expresan *MGMT* y otras que no. Sus resultados indican que las áreas de metilación que afectan a la expresión del gen no están uniformemente distribuidas a lo largo de toda la isla CpG. La hipermetilación de regiones específicas de la isla está asociada con procesos de heterocromatinización de regiones implicadas en el inicio de la transcripción (Watts et al., 1997). Parece que la región amplificadora “*enhancer*” y la correspondiente al primer exón no codificante son especialmente proclives a altos grados de metilación y podrían ser más determinantes en el silenciamiento de *MGMT* (Everhard et al., 2009). Debido a que en la práctica clínica es muy complejo y costoso evaluar un gran número de CpGs, cada método de detección focaliza su análisis en un pequeño grupo y es por ello que la mayoría de los test utilizados analizan de forma específica CpGs que se encuentran dentro de estas regiones.

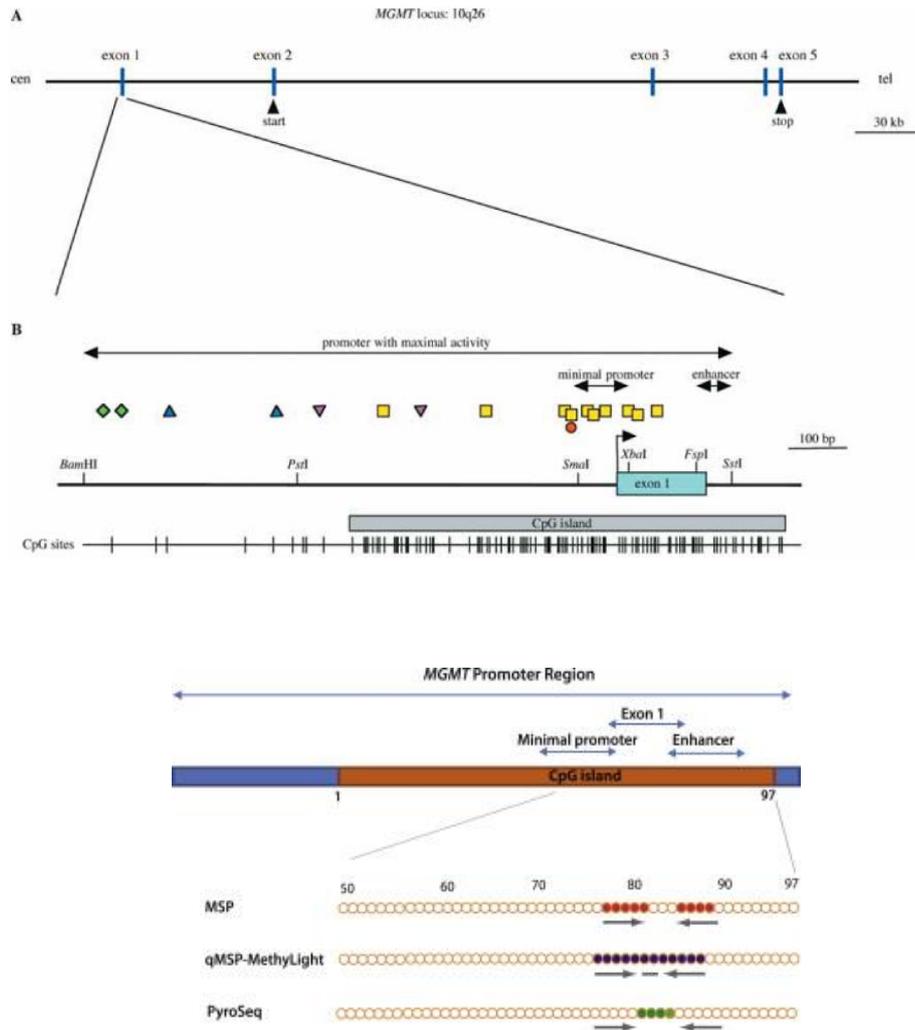


Figura 12. (A) Estructura completa del gen MGMT. El gen contiene aproximadamente 300kb y está localizado en el locus 10q26. Contiene 5 exones, el primero de los cuales es no codificante y alrededor del cual se sitúa la región promotora de máxima actividad. El ARNm resultante consta de 866 pb y codifica una proteína de 207 aminoácidos (adaptado de Nakagawachi et al., 2003). (B) Amplificación de la región promotora del gen MGMT. El promotor contiene una isla CpG que incluye 97 dinucleótidos CpG. Las regiones promotora mínima y amplificadora aparecen señaladas con flechas. Los sitios de unión de factores de transcripción aparecen representados de la siguiente forma: elementos sensibles a corticoides (diamante), AP1 (triángulo), AP2 (triángulo invertido), SP1 (cuadrado). Diagrama adaptado de Nakagawachi et al., 2003 (C) Diagrama en el que se representan algunos test moleculares para la detección del estado de metilación del promotor del gen. Se ejemplifica la MSP, la pirosecuenciación y la técnica MethyLight por su mayor frecuencia de uso. Se observa que, aunque existen diferencias entre los test, con respecto a las que se representan en el diagrama, todas analizan nucleótidos CpG situados en torno a la región amplificadora, promotora mínima y al primer exón (adaptado de Weller et al., 2010).

B.3. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DEL ESTADO MGMT EN MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL

Las implicaciones pronósticas y terapéuticas que tiene la determinación del *status* de MGMT en las muestras de tejido tumoral han generado un debate sobre cuál debería ser la mejor manera de determinarlo. En condiciones ideales, un test debería ser estandarizado, generar resultados reproducibles en laboratorios independientes y tener un valor de corte relevante con significación pronóstica. Se han testado diferentes metodologías, que incluyen los niveles de ARNm o proteína, la actividad enzimática, o la metilación del promotor del gen.

La actividad enzimática de MGMT puede ser determinada en preparaciones de lisados celulares procedentes de muestras de tumor en fresco o congelado. Los principales inconvenientes de este método incluyen la frecuente contaminación de las muestras por parte de células no tumorales y la complejidad técnica del procesamiento de las mismas. La técnica se basa en la medición de grupos metilo previamente marcados con el radioisótopo tritio que han sido transferidos desde la posición O⁶ de residuos de guanina a la proteína MGMT en extractos celulares. Un estudio determinó un aumento de la actividad del enzima MGMT en pacientes con recidivas de tumores que previamente habían sido tratados con agentes alquilantes, sugiriendo que estos podrían inducir una mayor expresión del gen o producir una selección clonal de líneas celulares con mayor expresión de esta proteína (Wiewrodt et al., 2008); ya que este fenómeno no ocurría en la cohorte de pacientes tratados únicamente con radioterapia. Sin embargo, estos datos no fueron publicados de manera prospectiva ni en relación paralela con la determinación de la metilación del promotor del gen.

Los niveles de proteína MGMT pueden estudiarse mediante técnicas de inmunohistoquímica, Western Blot o inmunofluorescencia. Estudios antiguos demostraron la asociación entre niveles bajos de proteína MGMT medidos mediante inmunohistoquímica y mejor respuesta a agentes citotóxicos como la carmustina (BCNU) (Jaeckle et al., 1998). De forma similar, estudios más recientes han relacionado valores bajos de detección de proteína MGMT con una mejor respuesta a agentes alquilantes, mayor supervivencia global e intervalo libre de progresión en glioblastoma de nuevo diagnóstico (Chinot et al., 2007). Sin embargo, la utilidad clínica de la detección inmunohistoquímica de MGMT sigue siendo controvertida por distintas razones: en primer lugar, no ha demostrado estar relacionada de forma consistente con el pronóstico; por otro lado, parece que existe una gran variabilidad interobservador que afectaría a la reproducibilidad de este método (Preusser et al., 2008); por último, diversos autores no han podido demostrar una asociación directa entre la metilación del promotor *MGMT* medido mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación (MSP) y los niveles de proteína MGMT mediante determinación inmunohistoquímica (Brell et al., 2005; Preusser et al., 2008; Rodriguez et al., 2008). La falta de correlación entre métodos podría estar explicada por diversas causas: por una parte, la contaminación de las muestras por parte de células no tumorales que expresan MGMT puede ser muy variable; además, debe tenerse en consideración que no está claramente determinado el rango a partir del cual se considera elevada la expresión de MGMT, que puede variar entre un 10 y un 50% de positividad según los estudios (Chinot et al., 2007).

El ARNm del gen *MGMT* ha sido también propuesto como posible método para evaluar la respuesta a citotóxicos (Tanaka et al., 2005). Su cantidad puede evaluarse a partir de muestras en fresco, aunque la contaminación que produce el ARNm procedente de células

no tumorales hace que los resultados puedan ser difíciles de interpretar, por lo que se trata de una técnica rara vez utilizada en la práctica clínica diaria. La preselección previa de células tumorales en las muestras y el manejo cuidadoso de las mismas son acciones importantes a tener en cuenta a la hora de realizar este método.

El estado de metilación del promotor del gen *MGMT* se ha postulado como el método más reproducible y de mayor fiabilidad, relacionado directamente con la supervivencia en pacientes afectados de gliomas de alto grado y tratados con nitrosureas (Esteller et al., 2000) o temozolamida (Hegi et al., 2004). Dichos hallazgos sugirieron que su análisis podría ser utilizado como un biomarcador predictivo de buena respuesta a agentes alquilantes añadido al tratamiento con radioterapia. Los resultados del estudio aleatorizado EORTC-26981-22981-NCIC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer & National Cancer Institute of Canada*) confirmaron estos hallazgos (Stupp et al., 2005), en los que se postuló a la metilación del promotor *MGMT* como un predictor específico de mayor intervalo libre de progresión en pacientes tratados con radioterapia y temozolamida. En contraposición, apenas se observaron diferencias pronósticas en función del estado de metilación en los pacientes que habían recibido sólo radioterapia como tratamiento complementario (Hegi et al., 2005). Para su análisis, existen diferentes métodos de detección molecular utilizados en la práctica clínica que serán detallados a continuación.

B.4. TÉCNICAS DE ESTUDIO DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *MGMT*

B.4.1. Pretratamiento de las muestras del ADN genómico

Los test diseñados para el estudio del estado de metilación del gen *MGMT* intentan predecir la metilación global de la región promotora, relacionada con el silenciamiento genético, analizando únicamente el estado de metilación de una fracción de nucleótidos CpG. Los distintos test disponibles en el mercado interrogan diversos CpGs, aunque la mayoría tienden a estudiar los próximos a la región amplificadora, como se reseñó en el apartado anterior y puede observarse en la figura 12.

El ADN genómico debe extraerse en primer lugar de muestras fijadas con formol e incluidas en parafina. Es de gran valor que las láminas teñidas con hematoxilina-eosina sean evaluadas por un neuropatólogo para realizar una microdissección de las zonas con mayor número de células tumorales y evitar contaminantes no tumorales o áreas de necrosis.

Una vez que el ADN ha sido extraído y cuantificado; la mayoría de los test diagnósticos pueden diferenciar los residuos metilados de los no metilados debido a un tratamiento inicial con bisulfito. Como puede observarse en la figura 13, la interacción con bisulfito induce la conversión de citosinas no metiladas en uracilo, no ocurriendo así en el caso de citosinas metiladas, que permanecen inalteradas tras el tratamiento. Estas diferencias en la transformación han permitido la creación de cebadores o “*primers*” específicos para secuencias metiladas y no metiladas que actúan como puntos de inicio a partir del cual la ADN polimerasa procede a sintetizar el fragmento que será amplificado y cuantificado en el

análisis PCR. En la figura 13 puede advertirse cómo los grupos uracilo son reemplazados por timidina en la amplificación mediante PCR, mientras que los de citosina permanecen sin cambios. Por consiguiente, si existiese una conversión incompleta en el tratamiento con bisulfito, un residuo de citosina no metilado podría interpretarse como metilación positiva en la cuantificación posterior, generando así un falso positivo en cualquiera de las técnicas utilizadas. Es por ello que la mayoría de las casas comerciales proporcionan kits de control para comprobar que la conversión se ha realizado adecuadamente. Además, ha de tenerse en cuenta que el ADN tratado con bisulfito es altamente inestable y debe analizarse de forma preferente o almacenarlo a bajas temperaturas.

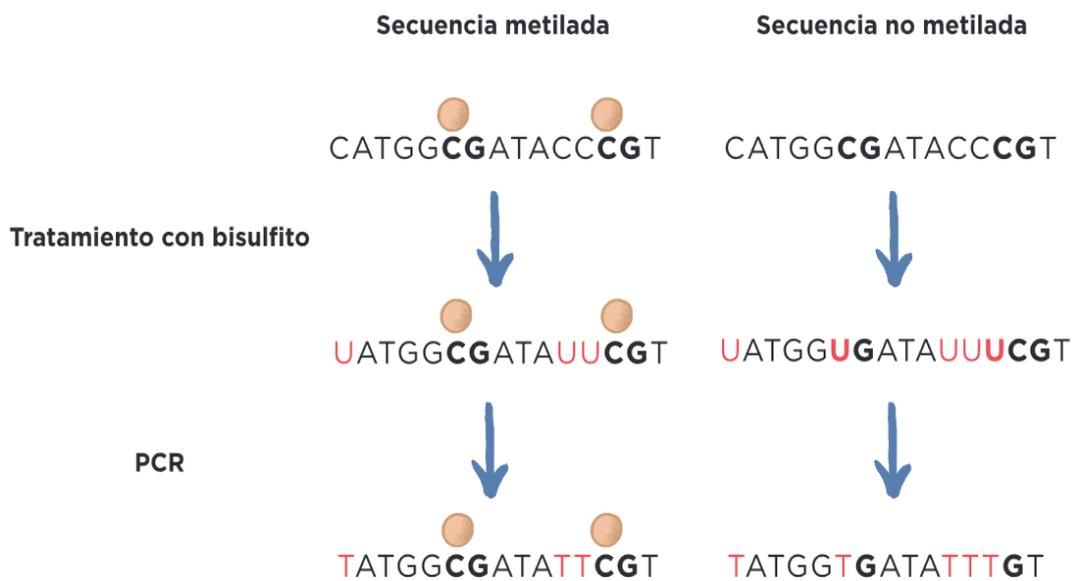


Figura 13. Tratamiento con bisulfito. Las citosinas no metiladas se convertirán en timidina tras la amplificación por reacción de PCR, mientras que las metiladas permanecerán inalteradas.

B.4.2. Técnicas específicas para el estudio de metilación

La reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación (MSP; *Methylation-specific polymerase*) ha sido la técnica más utilizada hasta el momento, en la que se emplea la técnica convencional de los análisis PCR para determinar la metilación del promotor del gen *MGMT*. Su fundamento consiste en amplificar los fragmentos de ADN deseados a través de termocicladores, gracias a la acción de las ADN polimerasas, utilizando cebadores o iniciadores específicos diseñados para unirse a secuencias completamente metiladas o no metiladas del promotor del gen *MGMT* (Herman et al., 1996). Cada cebador puede analizar entre tres y cinco CpGs. Los productos que se obtienen tras la PCR pueden visualizarse en gel de agarosa o gel capilar, son de fácil interpretación y no requieren un presupuesto elevado o equipos complejos para su análisis, por lo que su incorporación a laboratorios de medicina molecular resulta más sencilla. Sin embargo, la técnica MSP no incluye un control para asegurar la conversión completa con bisulfito, pudiendo generar falsos positivos. Además, no proporciona información cuantitativa acerca del estado de metilación, diferenciando únicamente las muestras entre metilación positiva o negativa.

La técnica MethyLight es un análisis cuantitativo que utiliza la tecnología de PCR en tiempo real; ésta es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación del ADN. Esta metodología incluye el uso de sondas con tecnología TaqMan (Eads et al., 2000).

Las sondas TaqMan contienen un fluoróforo (molécula con capacidad fluorescente) unido al extremo 5' de un oligonucleótido y un inhibidor de la fluorescencia denominado *quencher*. Estas sondas están diseñadas para hibridar con la región objeto de estudio en la

cadena de ADN a partir de los *primers* o cebadores específicos. A medida que la Taq polimerasa va sintetizando la hebra en sentido 5'-3', la actividad exonucleasa que tiene esta misma enzima va degradando la sonda TaqMan hibridada al ADN. La degradación de la sonda separa el fluoróforo del *quencher*, permitiendo así la emisión de fluorescencia, que va a variar en función de la cantidad de fluoróforo liberado. La metodología MethyLight incluye un control de la conversión con bisulfito y proporciona datos cuantitativos sobre la metilación. Se cree que es más específica que la MSP clásica ya que analiza un mayor número de CpGs (entre 12 y 14). El análisis de PCR en tiempo real proporciona datos fáciles de interpretar y probablemente disminuye la probabilidad de falsos positivos, pero los laboratorios deben tener acceso a este tipo de análisis, más costosos. Además, el uso de esta técnica para una cuantificación precisa de la metilación del promotor *MGMT* no se recomienda, postulándose más como una técnica semicuantitativa.

La pirosecuenciación es la técnica realizada en nuestro centro y la elegida para el análisis que da fruto al segundo trabajo de esta tesis. En ella, se puede determinar el orden de una secuencia de ADN mediante luminiscencia. Se trata de una técnica de secuenciación por síntesis, en la que se va obteniendo la información de qué nucleótidos componen el replicón a medida que se va formando la hebra, gracias a reacciones químicas de luminiscencia generadas por los pirofosfatos. Dicho proceso se explicará de forma pormenorizada en el apartado de Material y Métodos. El análisis por pirosecuenciación requiere un tratamiento previo con bisulfito del ADN extraído y proporciona información cuantitativa y fiable sobre la metilación de entre 4 y 12 CpGs. Debido al elevado coste del equipamiento requerido, suele utilizarse únicamente en laboratorios que manejan un gran número de muestras.

La técnica MS-MLPA (*Methylation-Specific Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*); puede ser traducida al castellano como amplificación de sondas tras ligadura múltiple. En ésta, pueden amplificarse diversas secuencias diana del ADN utilizando un único par de cebadores mediante un proceso similar al que se usa en la PCR, añadiendo previamente un proceso de digestión que se consigue gracias a la actividad endonucleasa del enzima HhaI, que va a tener lugar en algunos de los complejos formados entre el ADN genómico y las sondas (Jeuken et al., 2007). Tras la desnaturalización del ADN genómico y la hibridación con las sondas específicas de metilación, se utiliza la endonucleasa HhaI que digiere únicamente los complejos formados por sonda y secuencias no metiladas. De esta manera, los complejos que han sido digeridos no pueden ser amplificados en la reacción PCR y únicamente los complejos que incluyen secuencias metiladas serán amplificados y generarán una señal normal. Para determinar el porcentaje de secuencias metiladas, el producto que se obtiene tras la hibridación inicial va a separarse en dos partes iguales; y sólo uno de ellos va a ser sometido al proceso de digestión provocado por HhaI. Así, tras la amplificación de productos generados por PCR se podrán comparar los productos obtenidos en el ADN total y sólo la fracción metilada en cada una de las muestras; utilizando posteriormente la electroforesis en gel capilar para su cuantificación. La principal ventaja de este método semicuantitativo es que no requiere tratamiento previo con bisulfito, por lo que se evita una fase problemática en la que se puede inducir daño adicional a la cadena de ADN.

Otra técnica menos utilizada basada en el análisis de productos generados por métodos de PCR tras conversión inicial con bisulfito se denomina análisis de alta resolución de fusión específico de la metilación o MS-HRM (de sus siglas en inglés; *Methylation Specific High-Resolution Melting*). Su fundamento reside en el análisis de las diferencias en

las curvas de fusión que producen las diferentes cadenas de ADN. El análisis MS-HRM comienza con una PCR en tiempo real en la que se amplifican las secuencias de interés y se añaden colorantes fluorescentes. Los productos resultantes se irán calentando gradualmente, produciendo la desnaturalización progresiva del ADN y la emisión de fluorescencia, generando una gráfica. En estas curvas “melting” se pueden detectar cambios de una sola base, ya que las diferentes secuencias van a presentar pequeñas variaciones en la temperatura de desnaturalización. MS-HRM es considerado un método semicuantitativo, ya que estima el porcentaje de las secuencias que presentan metilación en función de las curvas de fusión que generan productos PCR con grados de metilación conocida (Wojdacz & Dobrovic, 2007). Es una técnica que evalúa hasta 18 CpGs, estandarizada y de alto rendimiento; sin embargo, no se ha definido un umbral límite con valor pronóstico significativo.

La tabla 2 resume las principales características, ventajas e inconvenientes que presentan las diferentes técnicas utilizadas en la práctica clínica para el análisis específico de los perfiles de metilación del promotor *MGMT*. Además de los métodos previamente descritos, se recoge la MSP-cuantitativa (qMSP) (Vlassenbroeck et al., 2008) y el análisis combinado de restricción con bisulfito (COBRA; *COmbined Bisulfite Restriction Analysis*) (Mikeska et al., 2007; Xiong & Laird, 1997). Cada tecnología debería definir un umbral en el valor de metilación con efecto pronóstico, que tendrá que ser validado de forma prospectiva; para ello, los métodos cuantitativos parecen más aptos para la definición de límites pronósticos que los cualitativos o semicuantitativos. Además, los métodos que analizan la metilación con respecto a un control completamente metilado podrían infraestimar el grado de metilación, ya que la contaminación por parte de tejido no tumoral podría contribuir a la señal del gen control. Por todo ello, el tejido que se utilice para la extracción de ADN debe

ser previamente revisado por un neuropatólogo con el fin de evitar zonas de infiltración linfocitaria o de gran proliferación vascular e incluir muestras compactas de tejido tumoral.

Método	Tto.	CpGs	Propiedades	Principio	Lectura	Ventajas	Inconvenientes
MSP clásica	B	9	Cualitativo	Amplificación de secuencias metiladas y no metiladas mediante <i>primers</i> específicos	En gel, presencia o ausencia de metilación	Barato Sensible Fácil reproducción	Dificultad para estandarizar
qMSP	B	8	Cuantitativo	MSP en tiempo real	Amplificación selectiva de secuencias metiladas vs gen β -actina (control)	Alto rendimiento Estandarizado	Restringido al reconocer sólo promotor completamente metilado
MethyLight	B	12	Semicuant.	MSP en tiempo real utilizando una sonda TaqMan	Amplificación selectiva de secuencias metiladas vs gen control	Alto rendimiento Estandarizado	Laborioso Definición del punto de corte
Pirosecuenciación	B	4-12	Cuantitativo	Secuenciación por síntesis	Porcentaje de metilación de los CpGs estudiados	Estandarizado Alto rendimiento Control de conversión con bisulfito	Definición del punto de corte
COBRA	B Enz. restricción	5	Semicuant.	Corte por parte de enzimas restringido a secuencias metiladas	En gel, porcentaje de secuencias digeridas	Específico Control de conversión con bisulfito	Laborioso Definición del punto de corte
MS-MLPA	Enz. Hha I	4	Semicuant.	Únicamente se amplifican los complejos metilados (no digeridos)	Relación entre productos de ADN total y los tratados con enzima	No bisulfito Alto rendimiento	Definición del punto de corte
MS-HRM	B	18	Semicuant.	Cambio en las curvas de fusión en relación con la presencia de secuencias metiladas	Desviación con respecto a una curva estándar	Estandarizado Alto rendimiento Evalúa muchas CpGs.	Definición del punto de corte.

Tabla 2. Técnicas de diagnóstico molecular utilizadas en la determinación del estado de metilación del promotor del gen MGMT. Leyenda: Tto.: tratamiento previo del ADN, CpGs: cantidad de CpGs analizadas, B: bisulfito, Enz.: enzima, Semicuant.: semicuantitativo.

B.5. CAMBIOS EN EL ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR *MGMT* ESTUDIADOS EN LA REINTERVENCIÓN DE GLIOMAS DE ALTO GRADO

B.5.1. Primeras observaciones

La primera publicación que relata un cambio en el estado de metilación del promotor *MGMT* se realiza en un estudio del año 2003, en el que se discute el valor pronóstico de esta modificación epigenética en gliomas de bajo grado (Komine et al., 2003). Posteriormente, fueron reportadas nuevas observaciones incidentales de cambios de metilación en el promotor del gen (Cankovic et al., 2007; Metellus et al., 2009; Tanaka et al., 2010). El conjunto de estas observaciones sugirió que la metilación del promotor *MGMT* podría no ser estable en el transcurso de la progresión de la enfermedad y propició la creación de nuevas publicaciones científicas para estudiar sus posibles implicaciones clínicas.

El primer trabajo focalizado en este fenómeno data de 2007. En él, diversas muestras pareadas de pacientes afectos de glioblastoma a los que se les había sometido a una segunda intervención fueron analizadas mediante MSP, encontrando que había ganancias, pérdidas y casos en los que el *status* no metilado del promotor de *MGMT* permanecía inalterado (Parkinson et al., 2007). Años más tarde, un estudio que pretendía analizar la relación entre la metilación del promotor y la actividad enzimática *MGMT* comparó también las muestras obtenidas en la primointervención con sus homólogas en la recurrencia, encontrando algunos casos en los que se había reducido o perdido la metilación (Christmann et al., 2010). De forma similar, otro trabajo que evaluaba la conexión entre las variaciones de metilación de

MGMT y la expresión de proteína, encontró que en un tercio de los casos estudiados en la recidiva el *status* de metilación había cambiado (Jung et al., 2010). Un grupo japonés analizó la relación entre la expresión de ARNm del gen *MGMT* y la metilación de su promotor en gliomas de bajo y alto grado, detectando la pérdida de metilación en más de un 80% de los casos cuando se comparaban con las muestras obtenidas en la primointervención (Suzuki et al., 2011). Los autores postulan que los clones celulares resistentes a la quimioterapia o células madre carcinogénicas podrían estar implicados en la progresión o recidiva de la enfermedad.

B.5.2. Literatura específica sobre cambios de metilación

Posteriormente, ensayos con un tamaño muestral mayor cuantificaron una tasa menor de cambios en la metilación del promotor de *MGMT*. El grupo de Brandes y colaboradores observó cambios en un 25% de las muestras; destacando que todos los pacientes de la serie recibieron tratamiento con radioterapia y temozolamida adyuvante, para eliminar los posibles sesgos derivados del impacto de los diferentes esquemas de tratamiento tras la primera intervención. Además, la metilación de *MGMT* en la primointervención se asoció de forma significativa a la supervivencia global, no siendo así en el caso de la reintervención, por lo que los autores sugieren que repetir la medición tras la cirugía de rescate no tendría tanta rentabilidad pronóstica (Brandes et al., 2017). Bajos porcentajes de cambio (11%) fueron también reportados por Felsberg y colaboradores, por lo que postulan el estado de metilación del promotor de *MGMT* permanece constante en la gran mayoría de los pacientes y consideran que es innecesario repetir la determinación tras un nuevo procedimiento (Felsberg et al., 2011).

Debemos tener en cuenta que la mayor parte de los trabajos citados previamente utilizan la técnica de MSP para su análisis y que el tipo de técnica utilizada podría revelar resultados muy diferentes, tal y como demuestra el estudio de Park y colaboradores. En él, sólo un 8% de los pacientes experimentan cambios en el patrón de metilación cuando son analizados mediante MSP, pero se observa un descenso hasta en el 75% de las muestras al utilizar la técnica de MS-MLPA. Es por ello que sugieren que una gran parte de los cambios podrían no detectarse al utilizar técnicas de naturaleza cualitativa (C.-K. Park et al., 2012).

Existen asimismo trabajos que determinan los cambios de metilación del promotor de *MGMT* utilizando otras técnicas. O'Regan y colaboradores reportaron una tasa de modificación en el 36% de los pacientes utilizando la pirosecuenciación, aunque dichos cambios no parecían estar en relación a la supervivencia global o al intervalo libre de progresión (O'Regan et al., 2018). Feldheim y colaboradores publicaron recientemente los resultados de su estudio en el que utilizan la técnica de HRM. Afirman que los cambios en el *status* de metilación se producen en ambas direcciones, y al ser la HRM una técnica de carácter cuantitativo; observan que tumores considerados metilados en la primointervención aumentan el grado de metilación al analizar las muestras procedentes de la reintervención. De forma similar a estudios previos, tampoco encuentran asociación entre el estado de metilación del promotor de *MGMT* en la reintervención y los datos de supervivencia (Feldheim et al., 2019).

Este mismo trabajo realiza una revisión de la literatura hasta 2019 de los artículos que estudian este fenómeno de cambio epigenético en recidivas de glioblastoma. Teniendo en cuenta la totalidad de los estudios, se analizan 476 pacientes, de los que, en un 24%, se produce un cambio en el estado de metilación del promotor de *MGMT* durante la evolución

de la enfermedad. Los cambios se reportan en ambas direcciones; siendo más frecuente la variación de “metilado” a “no metilado” (62%) que la de “no metilado” a “metilado” en la reintervención (38%). Aunque estos datos son útiles para la comprensión de la epidemiología global de este fenómeno, existen diferentes sesgos que han de tenerse en consideración, ya que los estudios incluidos emplean diversas técnicas de diagnóstico molecular, con diferentes valores de corte y criterios de selección de pacientes (Feldheim et al., 2019).

B.5.3. Mecanismos implicados en los cambios encontrados

Se han postulado diferentes razones para explicar los cambios que se producen a nivel epigenético en el gen *MGMT*; entre los que destacan aspectos técnicos, factores biológicos del propio tumor y causas relacionadas con el tratamiento quimioterápico.

Los resultados que proporcionan las diferentes técnicas utilizadas podrían explicar parte de ellos, ya que la MSP es el método empleado en la mayoría de trabajos y provee información dicotomizada (metilado/no metilado) mientras que otras técnicas proporcionan datos adicionales acerca del grado de metilación y su eventual aumento o disminución porcentual.

Por otro lado, existen factores en relación con la calidad de la muestra a estudio, ya que la contaminación por parte de células no tumorales, infiltrados inflamatorios o tejido necrótico podrían llevar a una estimación incorrecta del grado de metilación del promotor de *MGMT*. No obstante, parece que únicamente las muestras que divergen de forma importante en cuanto al contenido de células tumorales podrían alterar los resultados, ya que un estudio

determinó que muestras que diferían en hasta un 40% en contenido tumoral mostraban resultados similares de metilación del promotor del gen *MGMT* (Parker et al., 2016).

Desde otra perspectiva, factores inherentes a la biología molecular del tumor podrían explicar parte de las diferencias encontradas. Algunos trabajos han analizado el estado de metilación del promotor de *MGMT* en diferentes partes del mismo tumor con resultados variables. Los primeros estudios que apuntaban hacia una homogeneidad intratumoral en la metilación del promotor de *MGMT* (Grasbon-Frodl et al., 2007; Hamilton et al., 2011) se han visto parcialmente confrontados por estudios más recientes en los que se han encontrado datos de heterogeneidad en una parte de los tumores estudiados (Barresi et al., 2021; Della Puppa et al., 2011). Por ello, la heterogeneidad intratumoral no puede excluirse como posible mecanismo que influiría en la erradicación de las líneas celulares sensibles a la quimioterapia y la expansión de las resistentes, posiblemente implicadas en las recidivas tumorales.

De forma especial estudiaremos los cambios epigenéticos a nivel del gen *MGMT* producidos en respuesta al tratamiento con agentes alquilantes. La temozolamida es un agente alquilante oral que se administra como profármaco y atraviesa de forma eficiente la BHE. Su metabolito activo interacciona con la molécula de ADN transfiriendo grupos metilo a las bases nitrogenadas. Únicamente un 5% de las reacciones de metilación inducidas por la TMZ producen O⁶-mG, y se desconoce por qué son las más determinantes para la eficacia del fármaco. La metilación de residuos de guanina en posición O⁶ produce un emparejamiento aberrante con timidina en lugar de citosina. Dicha anomalía es reconocida por sistemas enzimáticos de reparación, pero al persistir se desencadenan los procesos de muerte celular programada. Por consiguiente, el efecto reparador que produce el enzima *MGMT* en los tejidos está relacionado con la resistencia a la TMZ.

Se ha descrito que la terapia con temozolamida conlleva una hipermetilación global del ADN seguida de procesos de desmetilación, lo que ha llevado a debatir si el propio tratamiento con TMZ podría inducir resistencia contra sí misma debido a un remodelado en los patrones de metilación (Barciszewska et al., 2015). Los resultados de los estudios que analizan esta cuestión son, otra vez, contradictorios. Algunos no encuentran relación entre cambios en el status del promotor *MGMT* y el tratamiento previo con TMZ (Jung et al., 2010) mientras que otros señalan que la terapia con alquilantes supone un factor determinante para las modificaciones epigenéticas (Barciszewska et al., 2015). Existen además varios trabajos que han comparado los cambios producidos en el promotor de *MGMT* realizando un análisis de subgrupos en función del tratamiento recibido con conclusiones divergentes. Felsberg y colaboradores separaron los pacientes en dos cohortes según hubieran sido tratados con radioterapia únicamente frente a radioquimioterapia concomitante, sin detectar diferencias significativas (Felsberg et al., 2011). En cambio, el grupo de Brandes descubrió que existían cambios en el patrón de metilación dependiendo de si el paciente recibía la radio y la quimioterapia de forma secuencial o concomitante (Brandes et al., 2010).

Capítulo I

DETERMINACIÓN DEL IMPACTO PRONÓSTICO DE LA REINTERVENCIÓN EN PACIENTES AFECTOS DE GLIOMAS DE ALTO GRADO

1. JUSTIFICACIÓN

Tras la revisión de las múltiples alternativas que existen para el manejo de las recidivas de gliomas de alto grado, se comprende que todas comparten un carácter paliativo y que ninguna ha demostrado ser muy superior en términos de mayor supervivencia o de brindar intervalos libres de progresión de la enfermedad más largos. Aunque parece que el pronóstico general ha mejorado ligeramente con el refinamiento de los tratamientos y la implementación de nuevas técnicas (De Souza et al., 2015), las medianas de supervivencia en glioblastoma tras la recidiva rara vez superan los 12 meses en las diferentes series. Como se comentará con posterioridad en el apartado de Discusión, existe bastante controversia en torno al impacto pronóstico que tienen las cirugías de rescate en estos pacientes, y parece que los estudios que otorgan a este procedimiento mayor influencia sobre la supervivencia podrían presentar importantes sesgos de selección. Además, parece poco probable que se puedan realizar estudios aleatorizados por los aspectos éticos que esta situación conlleva y, por ende, es posible que nunca exista evidencia de clase I en la literatura al respecto.

El primer capítulo de esta tesis analiza retrospectivamente el impacto en la supervivencia que tiene la reintervención seguida de tratamientos sistémicos en los pacientes de nuestra serie, afectos de gliomas de alto grado, y lo compara con otras modalidades terapéuticas que se adoptaron ante el diagnóstico de la recidiva. Las alternativas a la reintervención para los pacientes de nuestra serie fueron el tratamiento con quimioterapia de segunda línea en los casos en los que la resección total de la recidiva no se consideró posible o se presumió acompañada de focalidad neurológica no asumible, y el tratamiento sintomático exclusivo para los pacientes con mal estado funcional y que con mucha probabilidad no

tolerarían un régimen de quimioterapia adicional. En nuestro centro no se plantea, de forma general, el tratamiento con radioterapia adicional y no están disponibles las modalidades de TTFs o LITT. En el momento de escribir esta tesis, nuestro centro no estaba involucrado en ningún ensayo clínico multicéntrico con el objetivo de valorar la eficacia de nuevas terapias dirigidas al genotipo, anticuerpos monoclonales o vectores de tratamiento diseñados por ingeniería genética.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis conceptual: La reintervención quirúrgica tiene impacto pronóstico en los pacientes con glioblastoma.

Hipótesis de trabajo: La hipótesis que se pretende verificar o refutar es la relativa al valor pronóstico en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión, de la cirugía de rescate en la recidiva de una serie de glioblastomas tratados mediante un protocolo establecido común.

Objetivo general: Valoración del impacto pronóstico de la reintervención en una serie homogénea de pacientes con recidiva de gliomas grado IV de la OMS.

Objetivos específicos:

1. Valoración de los factores pronósticos en el grupo de pacientes con diagnóstico de glioma IV de la OMS tratados mediante resección quirúrgica y tratamiento complementario radio y quimioterápico frente al grupo tratado exclusivamente con radio y quimioterapia (biopsias diagnósticas).
2. Valoración de los factores pronósticos en el grupo de pacientes con recidiva de glioma grado IV de la OMS tratados mediante reintervención seguida de tratamiento sistémico, frente a los tratados exclusivamente con tratamiento sistémico.
3. Ponderación de la influencia pronóstica en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión de la reintervención en la recidiva de glioblastoma considerando la reintervención como covariable tiempo-dependiente.

4. Valoración de los factores pronósticos en el grupo de pacientes con diagnóstico de glioma III de la OMS tratados mediante resección quirúrgica y tratamiento complementario radio y quimioterápico frente al grupo tratado exclusivamente con radio y quimioterapia (biopsias diagnósticas).
5. Estudio comparativo de factores pronósticos y de supervivencia entre los pacientes tratados con reintervención frente a los que se indicó tratamiento sistémico en recidivas de gliomas grado III de la OMS.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Selección de pacientes

Para investigar el impacto pronóstico en términos de supervivencia que tiene una nueva cirugía en recidivas de gliomas de alto grado, se procedió al análisis retrospectivo de los pacientes con este diagnóstico tratados en nuestro centro entre el 01.01.2005 y el 31.12.2019.

Con el objetivo de crear nuestra serie, se investigó el archivo de historias clínicas y los documentos en papel que pertenecían al comité multidisciplinar de neurooncología para recopilar los casos más antiguos (2005-2010). A partir del año 2010, se realizó una búsqueda exhaustiva en el sistema informático de historias médicas de nuestro centro, denominado Millenium (*Cerner, North Kansas City, MI*). Entre el 01.01.2010 y el 31.12.2019 se seleccionaron todos los casos que incluían los siguientes códigos de procedimiento: Biopsia estereotáxica cerebral (01.13), Craneotomía + biopsia tumor cerebral (01.14), Craneotomía + exéresis de tumor cerebral (01.59) y Craneotomía fosa posterior (01.24). Posteriormente, se cotejó el resultado del análisis anatomopatológico de cada uno de ellos, excluyéndose las lesiones primarias o metastásicas que no correspondían a diagnósticos histológicos de gliomas de grado III y IV de la clasificación previa de la OMS (Louis et al., 2007).

Por tanto, se incluyeron los siguientes diagnósticos: Astrocitoma anaplásico grado III de la OMS, Oligodendroglioma anaplásico grado III de la OMS, Oligoastrocitoma anaplásico grado III de la OMS, Glioblastoma grado IV de la OMS y Gliosarcoma grado IV de la OMS. Se excluyeron asimismo los gliomas de alto grado en los que se conocía un diagnóstico

previo de lesión glial de bajo grado. El periodo de seguimiento de los pacientes finalizó el 31.12.2021, por lo que se considerarán censurados aquellos pacientes que a esa fecha continúan vivos.

3.2. Variables a estudio

3.2.1. Variables demográficas y clínicas iniciales

De cada uno de los casos se estudiaron diversas variables demográficas, radiológicas y clínicas, así como datos de supervivencia. Las variables demográficas extraídas de los primeros informes de Urgencias o de CCEE incluyen los datos básicos de la historia médica, como la edad al diagnóstico expresada en años o el sexo del paciente. Los antecedentes médicos fueron evaluados y se dicotomizaron en relevantes/no relevantes para analizar si el exceso de comorbilidad, se asociaba de forma significativa a alguna de las variables pronósticas. Tomando como ejemplo el índice de comorbilidad de Charlson (Charlson et al., 1994), se consideró que el paciente poseía antecedentes relevantes si presentaba alguna de estas patologías:

- Cardiopatía isquémica de clase III-IV (limitación de la actividad física ordinaria) o que haya requerido técnicas de revascularización.
- Insuficiencia cardiaca congestiva clases funcionales III-IV de la NYHA (asintomático en reposo, pero limitación marcada de la actividad física).
- Enfermedad vascular periférica.
- Hipertensión arterial que no se controla con dos fármacos antihipertensivos.
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; grados moderado y severo.

- Diabetes mellitus tipo 2 que no se controla con antidiabéticos orales o con afectación orgánica secundaria.
- Ictus isquémico o hemorrágico previo.
- Demencia.
- Antecedentes oncológicos y tratamientos previos con quimioterapia.
- Enfermedad renal crónica de grado 3 o superior (filtración glomerular inferior a 60ml/min).
- Enfermedad hepática crónica (reúne los suficientes puntos para catalogarse en alguno de los subtipos de la clasificación de Child-Pugh).
- Infección por VIH o criterios clínicos de SIDA.
- Indicación de tratamiento anticoagulante (TEP previo, FA...)

Los síntomas clínicos que motivaron la atención médica fueron agrupados dentro de diversas categorías. Si en la documentación clínica inicial se recopilaba más de un síntoma, se escogió el que parecía más importante o el que directamente llevó al paciente a procurar la atención hospitalaria. Por ejemplo, si el informe de urgencias relata “*Paciente que aqueja de cefalea frontal de dos meses de evolución, sufre en el día de hoy una crisis tónico-clónica generalizada, motivo por el que consulta*”, el caso se catalogará como “Crisis epilépticas”.

Las categorías codificadas son las siguientes:

- Déficit focal de tipo motor: paresia o plejía de algún miembro o hemicuerpo
- Déficit focal de tipo sensitivo: hipoestesia o anestesia de miembro o hemicuerpo
- Alteración del lenguaje: afasias motoras, sensitivas o mixtas

- Cefalea, vómitos o disminución del nivel de conciencia en probable relación con hipertensión intracraneal
- Alteración cognitiva o conductual
- Crisis epilépticas focales o generalizadas
- Síntomas visuales: hemianopsia
- Síndrome cerebeloso: ataxia, dismetría, mareos o alteración de la marcha
- Síndrome general: anorexia, síndrome febril, cansancio y pérdida de peso
- Asintomático: hallazgo casual

3.2.2. Neuroimagen

La RM preoperatoria fue analizada en el programa de visualización de imágenes médicas Centricity (*General Electrics HealthCare, Chicago, Illinois*) para la obtención de datos adicionales sobre el emplazamiento y volumen tumoral. Se utilizaron las siguientes codificaciones según la localización:

- Central: La lesión se localiza alrededor del surco central (cisura de Rolando). Las lesiones que asentaban sobre área motora primaria (giro precentral) o área sensitiva primaria (giro postcentral) no se catalogaron como frontal o parietal respectivamente, ya que, al situarse sobre áreas de gran elocuencia, era más frecuente que se practicasen biopsias diagnósticas en lugar de cirugías con intención radical debido al elevado riesgo de déficit neurológico permanente.
- Frontal: Lesiones ubicadas en el lóbulo frontal, excluyendo el giro precentral.
- Parietal: Localización entre el surco postcentral y el surco parieto-occipital, excluyendo las emplazadas en giro postcentral.

-Temporal: Ubicación en el lóbulo temporal, afectando tanto a sus partes lateral como mesial.

-Occipital: Localización entre el surco parieto-occipital y el polo occipital.

-Insular: Tumor que afecta primariamente al lóbulo de la ínsula, sin afectación de estructuras mediales como la cápsula interna o ganglios basales, ya que, si existe, la intención radical no puede plantearse.

-Multilobar: Con frecuencia, existen casos en los que los límites anatómicos identificados por RM no están claramente definidos debido a la alteración anatómica que produce la lesión y el edema asociado. Por ejemplo, un tumor temporal podría sobrepasar la encrucijada parieto-temporo-occipital, o una lesión eminentemente frontal tener una leve extensión insular. En estos casos el tumor se codificaría como temporal o frontal respectivamente. Únicamente se utilizó la codificación “Multilobar” para definir aquellas lesiones extensas que ocupan claramente dos o más lóbulos, ya que es posible que este factor influyese en la decisión terapéutica. Por ejemplo; un glioblastoma que invade el precuneus, cuneus y lóbulo occipital; o un astrocitoma anaplásico frontal izquierdo que asienta también sobre el lóbulo insular serían catalogados como lesiones multilobares.

-Afectación GGBB (ganglios basales), tálamo o cápsula interna: Independientemente de la afectación de otros lóbulos, existe invasión talámica, capsular o de los GGBB (núcleo caudado, putamen, globo pálido). Esta subcategoría engloba tumores de localización profunda, en general no resecables, en los que el neurocirujano debe plantear una biopsia diagnóstica.

-Afectación línea media: El tumor invade alguna de las comisuras interhemisféricas (siendo la más frecuente la invasión del cuerpo calloso) y puede afectar a ambos

lóbulos. Un ejemplo típico es el conocido glioma en alas de mariposa, que afecta a ambos lóbulos frontales por la extensión de las células tumorales a través de las fibras de la rodilla del cuerpo calloso. Aunque no existe unanimidad, este tipo de lesiones se han considerado históricamente irresecables, factor que influye de forma importante en los datos pronósticos.

-Tronco / fosa posterior: Lesiones localizadas en vermis, hemisferios cerebelosos o tronco encefálico.

-Intraventricular

-Selar/Paraselar

Además, se especificó la lateralidad de la lesión, con las siguientes posibilidades:

-Derecha

-Izquierda

-Línea media: El tumor está codificado como “Afectación línea media”.

El volumen lesional se estimó mediante la fórmula $\frac{a \cdot b \cdot c}{2}$, siendo:

-a: Diámetro máximo anteroposterior en cm medido en secuencias axiales.

-b: Diámetro máximo perpendicular al anterior (mediolateral)

-c: Diámetro máximo craneocaudal medido en secuencias coronales.

Así, se obtiene una estimación del volumen expresado en cm^3 , aproximada, ya que no se utilizó un software de análisis volumétrico en 3 dimensiones. La mayoría de las lesiones presentaban captación periférica de contraste, por lo que se usó dicha alteración de señal para la medición de los diámetros máximos sin tener en cuenta las alteraciones de señal

adyacentes presentes en secuencias T2/FLAIR. El volumen de las lesiones que no captaban contraste se estimó mediante las alteraciones de señal en secuencias T2/FLAIR (también se procedió de esta manera en los tumores que tenían pequeños focos de captación incluidos en lesiones con dominancia de alteración T2/FLAIR, sugestivos de transformación anaplásica). No se procedió a la medición en lesiones de presentación multicéntrica o en las que se realizó biopsia diagnóstica. Con este análisis, se pretende estudiar si el volumen tumoral es una variable pronóstica en nuestra serie.

3.2.3. *Tratamiento quirúrgico: indicaciones y aspectos técnicos*

Con respecto a la intención de tratamiento, la serie se dicotomiza en dos grandes grupos que se analizarán de forma independiente:

-Intención radical: Se plantea la resección completa o submáxima de acuerdo a las características del paciente y de la lesión.

-Biopsia diagnóstica: Indicada cuando la cirugía resectiva es desestimada por las características de la lesión o la comorbilidad del paciente. Se estudió también el tipo de procedimiento empleado, distinguiendo entre biopsia a cielo abierto, (mediante trépano o minicraneotomía) generalmente indicada para lesiones más superficiales; o biopsia estereotáctica, (con guía estereotáctica o con sistema “*frameless*” de neuronavegación) utilizada para tumores de localización profunda. A fin de analizar las indicaciones más frecuentes de biopsia en nuestra serie, se clasificaron en:

- Lesión profunda
- Lesión sobre área elocuente
- Lesión multicéntrica o multilobar
- Comorbilidad importante, mal estado funcional o edad avanzada
- Desconocido

En todos los casos se anotó la fecha de la intervención quirúrgica, considerándola como data de inicio a partir de la cual se calcularán los datos de supervivencia.

Se recogieron también los asistentes quirúrgicos utilizados por el neurocirujano en la primointervención:

-Ausencia de herramientas quirúrgicas

-Neuronavegación: Proporcionada por el sistema Stealth Station S7 (*Medtronic Navigation, Louisville, CO*).

-RM intraoperatoria: En nuestro centro se dispone desde el año 2011 de una RM de uso intraoperatorio de 0.15 Teslas para evaluar la extensión de la resección antes de dar por finalizado el procedimiento. El sistema de RM intraoperatoria Polestar N20 (*Medtronic Navigation, Louisville, CO*) lleva acoplado un dispositivo que permite la neuronavegación en tiempo real sobre la imagen obtenida en quirófano, obviando de esta manera la falta de precisión que existe al navegar sobre las imágenes preoperatorias cuando se realizan manipulaciones o resecciones (efecto “*brain shift*”)

-Neuronavegación y 5-ALA: A la navegación se suma la fluorescencia oncológica proporcionada por el ácido 5-aminolevulínico. Dependiendo de la época se ha

utilizado el fármaco Gliolan (*Gebro Pharma, Fieberbrunn, Austria*) o 5-ALA genérico.

-RM intraoperatoria y 5-ALA: Uso combinado de ambas tecnologías.

-Monitorización cortical intraoperatoria: “*mapping*” del lenguaje.

-Abordaje endoscópico para lesiones intra o yuxtaventriculares.

Con el objetivo de optimizar el análisis estadístico inferencial, se considerarán 3 grupos: “No asistentes”, “Navegación convencional”, o “Avanzado” (cuando se describe el uso de RM intraoperatoria, 5-ALA, o ambos).

3.2.4. *Anatomía patológica y diagnóstico molecular*

Se obtuvo el diagnóstico histopatológico de todos los casos. Puesto que se trata de una serie de 14 años, se utilizó la clasificación de la OMS anterior a la publicada en 2016 (Louis et al., 2007), debido a que el estado mutacional del enzima IDH no se conocía en la mayoría de los casos antiguos. Se clasifican los siguientes diagnósticos: Grado IV de la OMS (Glioblastoma, Gliosarcoma): Grado III de la OMS (Astrocitoma anaplásico, Oligodendroglioma anaplásico, Oligoastrocitoma anaplásico).

Dependiendo del año, ha sido posible recabar información adicional sobre tinciones inmunohistoquímicas y genética molecular.

La amplificación del gen *EGFR* y la codelección *1p/19q* (éste último, analizado únicamente en tumores con características oligodendrogliales) se estudiaron mediante técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH; *fluorescent in situ hybridization*). El

empleo de esta técnica se basa en la detección de secuencias específicas de un locus cromosómico utilizando secuencias de nucleótidos complementarias al ADN diana (sondas) que están marcadas con fluorocromos para valorar la hibridación. Esta metodología, que no requiere la extracción del ADN (in situ), permite la identificación de anomalías numéricas y estructurales cromosómicas. El protocolo de preparación de las muestras es similar para todos los procesos de FISH y consta de 3 fases principales (pretratamiento, hibridación, detección). En el pretatamiento, tras la selección de áreas con mayor contenido de tejido tumoral por parte del neuropatólogo, se realizan cortes de 2µm y calentamiento a 60°C. Posteriormente, pueden distinguirse dos subfases: desenmascaramiento y digestión enzimática. La primera tiene como objetivo el aumento de la permeabilidad de los tejidos para facilitar el acceso a las sondas y la ruptura de los enlaces creados por el formol, mientras que la segunda persigue la digestión de las histonas por medio de proteinasas K para conseguir la liberación de las hebras de ADN a estudio. La fase de hibridación comprende 3 subfases: desnaturalización (separación de las cadenas de ADN que se consigue a altas temperaturas), hibridación (incubación de la muestra con la sonda a estudio a temperaturas de 37-45°C) y astringencia (separación de los híbridos en determinadas condiciones de pH y temperatura). La detección implica la observación de las muestras obtenidas previamente tratadas con marcadores fluorescentes mediante el uso de un microscopio de fluorescencia.

El protocolo utilizado en nuestro centro se expone a continuación de manera resumida:

1. Desparafinado de la muestra mediante pase por la batería de alcoholes
2. Pretatamiento de las muestras con Vysis Pretreatment Solution 1N (*Abbott Molecular, Des Plaines, IL, EEUU*) al baño maría (15', 80°C)
3. Lavados con agua destilada (2 lavados de 5')
4. Digestión enzimática de la muestra con proteinasa K diluída en 4.5 ml de solución tampón Vysis Protease Buffer IV (*Abbott Molecular, Des Plaines, IL, EEUU*) a 37°C durante 10'
5. Lavados con agua destilada (2 lavados de 5')
6. Deshidratado con etanoles crecientes (OH 70°, 85°, 100° durante 2')
7. Aplicación de 3 a 5 µl de la sonda Vysis EGFR/CEP 7 FISH Probe Kit en el caso del estudio de la amplificación EGFR o Vysis 1p36/1q25 y 19q13/19p13 FISH Probe Kit para el estudio de la codelección *1p/19q* (*Abbott Molecular, Des Plaines, IL, EEUU*) sobre el tejido
8. Protección mediante cubreobjetos y sellado con pegamento
9. Proceso de hibridación mediante introducción en el "hybridizer" durante 3' a 73°C y 16 horas a 37°C
10. Retirada del pegamento y lavados con solución tampón Vysis Wash Buffer I (temperatura ambiente, 5') para despegar el cubreobjetos y posteriormente Vysis Wash Buffer II (74°C, 2') (*Abbott Molecular, Des Plaines, IL, EEUU*)
11. Lavados con agua destilada (2 lavados de 5')
12. Aplicación de 5-10 µl de 4',6-diamidino-2-fenilindol (marcador fluorescente).
13. Guardado de muestras en cámara oscura a 2-8°C e interpretación a los 15'

14. Valoración mediante microscopio de epifluorescencia Eclipse 80i (*Nikon, Tokyo, Japón*)

Para el estudio de la amplificación *EGFR*, el kit incluye una sonda de control centromérica (CEP7) marcada con fluorocromo de color verde que permite cuantificar el número de cromosomas 7 por núcleo, y una sonda marcada en rojo, que al hibridar con el gen *EGFR* permite determinar el número de copias del gen por núcleo analizado. Por tanto, se consideró que el tumor presentaba amplificación del gen si la ratio era mayor de 2. De manera análoga, el kit diseñado para el estudio de la codelección *1p/19q* también presenta las sondas que hibridan con los loci de interés (*1p36* y *19q13*) marcadas en rojo y las sondas de control (*1q25/19p13*) en verde. Se consideró que existía una pérdida de heterocigosidad *1p19q* si existía una pérdida de ambos brazos cromosómicos en más del 50% de las células estudiadas.

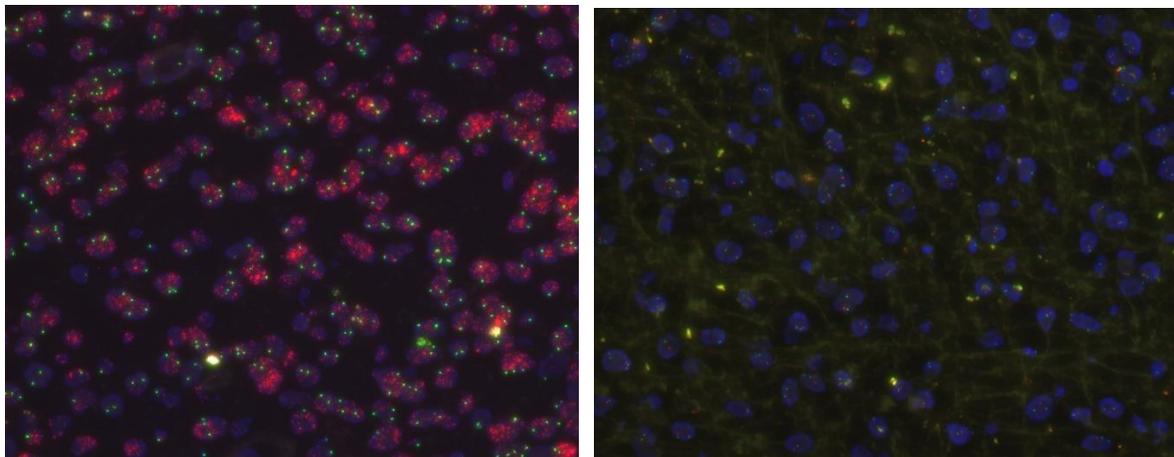


Figura 1. Microfotografías procedentes de un microscopio de fluorescencia. Izquierda: tumor con amplificación EGFR (mayor número de sondas marcadas con rojo que controles, en verde). Derecha: tumor con delección 1p (en más del 50% de las células se observa únicamente una sonda de color rojo, en relación con los controles, marcados en verde).

La determinación de p53, Ki-67 e IDH se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas. En el servicio de Anatomía Patológica se utiliza la detección basada en multímeros con haptenos para su mejor visualización (*tecnología ultraView™ DAB, Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, EEUU*). El análisis de las muestras se acompañó en todos los casos de controles negativos y positivos. La automatización de estas técnicas en nuestro laboratorio implica el uso de la plataforma BenchMark Ultra (*Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, EEUU*). El tratamiento de las muestras sigue un protocolo que a continuación se expone de manera resumida:

1. Desparafinización de las muestras mediante solución acuosa EZPrep (16' a 60°C)
2. Tratamiento con recuperador antigénico de pH alto. Se persigue el desenmascaramiento antigénico (reversión de los enlaces cruzados con moléculas de formol y restauración la configuración tridimensional de los epítomos) inducido por enzimas proteolíticas.
3. Aplicación de una gota de anticuerpo primario; anticuerpo monoclonal de ratón p53 (*Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, EEUU*), anticuerpo monoclonal de conejo Ki67 (*Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, EEUU*), o anticuerpo monoclonal de ratón IDH1-R132H (*Vitro Master Diagnóstica, Sevilla, ES*) e incubación de 24, 40 o 48' respectivamente
4. Inhibición de peroxidasas endógenas mediante H^2O^2 al 3% durante 4'
5. Aplicación de multímeros de anticuerpos (anticuerpos policlonales secundarios: IgG cabra anti-ratón; IgG cabra anti-ratón; IgG cabra anti-conejo conjugados con haptenos y anticuerpos monoclonales terciarios conjugados con peroxidasa de rábano picante que reaccionan contra los haptenos) durante 8'

6. Incubación de cromógeno (diaminobencidina, DAB) y H₂O₂ (sustrato de la reacción enzimática) durante 8' cada uno. Se producirá una reacción enzimática al reaccionar con la peroxidasa de rábano picante que hará precipitar un sustrato de color marrón

-p53: Se consideró positivo cuando la tinción era positiva en más de aproximadamente un 10% del total de la muestra.

-Ki67: Se obtuvo el resultado porcentual en un amplio número de casos, para observar si se trataba de una variable con impacto pronóstico en nuestra serie.

-IDH: Únicamente está disponible el estudio de la mutación *IDH1 Arg132* (más del 90% del total de mutaciones), no siendo posible el análisis de las mutaciones *IDH2 Arg140* y *Arg172*.

El estudio del grado de metilación del promotor del gen *MGMT* fue realizada en los casos de los últimos años de la serie mediante pirosecuenciación. Su implicación pronóstica y terapéutica ha sido descrita de forma pormenorizada en el capítulo anterior y la técnica de laboratorio se describirá detalladamente en el Capítulo II. En el primer trabajo de la tesis, se considera como variable categórica, catalogando las muestras como positivas (promotor hipermetilado/metilación intermedia) y negativas (no metilado) según los puntos de corte validados establecidos por Gurrieri y colaboradores, que se describirán en el próximo apartado (Gurrieri et al., 2018).

3.2.5. Datos sobre el postoperatorio inmediato

De la fase postoperatoria se obtuvieron datos sobre el grado de resección, las complicaciones postquirúrgicas y el estado funcional del enfermo.

En la gran mayoría de los casos en los que se planteó una intención radical se obtuvo una neuroimagen postoperatoria precoz (RM con contraste antes de las 96h tras la intervención, TC con contraste en algunos casos antiguos de la serie) para evaluar el grado de resección. Un pequeño número de casos tiene únicamente un TC sin contraste como imagen postoperatoria, por lo que la resección no pudo ser evaluada. Se distinguieron diferentes categorías:

- Resección total: También llamado GTR en esta tesis, por sus siglas en inglés, *gross total resection*. Se catalogaron de esta manera los casos que no presentaban ninguna imagen patológica de captación de contraste en la neuroimagen postoperatoria. Para evaluar el grado de resección en los casos en los que la lesión inicial no presentaba captación de contraste se analizó la zona de alteración de señal en las imágenes postoperatorias potenciadas en secuencias T2/FLAIR.
- Resección submáxima: Se denominó así de forma arbitraria a las neuroimágenes que presentaban pequeñas captaciones de contraste en la cavidad quirúrgica o pequeñas lesiones satélite no reseçadas. Estas no debían superar aproximadamente el 10% del volumen tumoral inicial.
- Resección parcial: Restos tumorales por neuroimagen mayores al 10% del volumen tumoral inicial.
- No valorable: Sólo se dispone de un TC sin contraste postoperatorio.

Con el objetivo de mejorar el análisis estadístico en el primer trabajo de esta tesis vamos a agrupar las resecciones submáximas y parciales bajo el término STR (por sus siglas en inglés, *subtotal resection*). Así, diferenciaremos los pacientes entre los que recibieron una resección completa y los que no (se objetivó algún resto tumoral en la neuroimagen postoperatoria, independientemente del tipo).

Las complicaciones postoperatorias se dividieron de acuerdo a la clasificación de complicaciones en neurocirugía de Landriel-Ibáñez (Ibáñez et al., 2011). Los autores proponen cuatro grados de eventos adversos en función de si su tratamiento requiere o no manejo invasivo, ingreso en una Unidad de Cuidados Intensivos o es la causa del fallecimiento del paciente. En nuestro trabajo, hemos adaptado la clasificación añadiendo escenarios no contemplados en la publicación original:

-Grado I: Incluye complicaciones leves que aumentan la estancia media hospitalaria, sin motivar una reintervención o provocar un déficit permanente al enfermo y que no requieren manejo con técnicas invasivas. Se distinguen dos subtipos (Ia y Ib) en función de si fue necesaria la terapia farmacológica (Ib: neumonía tratada con antibióticos o trombosis venosa profunda en la que se indica anticoagulación).

Consideramos también complicaciones tipo Ib los déficits de tipo motor, sensitivo o trastorno del lenguaje transitorios, pero presentes en el momento del alta hospitalaria.

-Grado II: Complicaciones que requieren un manejo mediante técnicas invasivas. Los subtipos (IIa y IIb) se definen en función del requerimiento de anestesia general (IIa: fistula de LCR postquirúrgica que requiere la colocación de una derivación lumbar

externa; IIb: absceso postquirúrgico evacuado mediante reapertura de craneotomía).

En nuestro trabajo, se adapta esta clasificación y se añade el déficit neurológico permanente e invalidante (hemiparesia menor de 3/5 en la escala de British MRC, afasia motora o sensitiva severa, alteración conductual severa en lesiones frontales...) a la categoría grado IIb, ya que son complicaciones que no requieren tratamiento invasivo, pero producen una morbilidad permanente y significativa en el enfermo. La hemianopsia homónima contralateral, típica en tumores temporo-occipitales (muchas veces ya presente en estudios campimétricos preoperatorios) no se consideró en este trabajo como complicación.

-Grado III: Se trata de complicaciones que amenazan la vida del paciente y requieren traslado a una Unidad de Cuidados Intensivos para su manejo. En función del número de órganos implicados se distinguen dos subtipos (IIIa y IIIb). A modo de ejemplo, un hematoma postoperatorio que ha producido disminución del nivel de conciencia y requiere evacuación se considerará complicación de grado IIIa, ya que es necesario el traslado a UCI para su manejo posterior.

-Grado IV: Complicaciones que derivan en el fallecimiento del paciente. Los subtipos (médicas o quirúrgicas) se definen en función de si estas se relacionan directamente con el procedimiento o no.

Grado I	No requieren tratamiento invasivo / Déficit NRL transitorio
Grado Ia	Resolución espontánea
Grado Ib	Indicado tratamiento farmacológico / déficit NRL tras alta
Grado II	Requieren tratamiento quirúrgico / Déficit NRL permanente
Grado IIa	Indicada intervención sin anestesia general
Grado IIb	Intervención con anestesia general / déficit NRL permanente
Grado III	Requieren ingreso en UCI
Grado IIIa	Alteración de un solo órgano
Grado IIIb	Fallo multiorgánico
Grado IV	Éxitus
Compl. Quirúrgicas	Directamente relacionadas con el procedimiento
Compl. Médicas	No directamente relacionadas.

Tabla 1. Clasificación de complicaciones. Adaptado y modificado del trabajo de Landriel- Ibáñez y colaboradores (Ibáñez et al., 2011).

Para optimizar el análisis estadístico, la evaluación de complicaciones se dicotomizará en ausente o presente (si se recoge alguna, independientemente del tipo).

La valoración funcional del paciente se determinó por la escala ECOG (Oken et al., 1982) debido a que es la que utiliza el servicio de Oncología Médica en sus historias clínicas por su simplicidad. La valoración funcional es un aspecto de extrema importancia que va a condicionar la decisión terapéutica en la mayoría de los casos. Para disminuir la variabilidad en el análisis de estadística inferencial, se crearán dos grupos: estado funcional bueno (ECOG 0-1) y sintomático (ECOG 2-3-4).

ECOG 0	Asintomático y capaz de realizar trabajo y actividades normales de la vida diaria.
ECOG 1	Síntomas leves que impiden realizar trabajos arduos, aunque realiza actividades cotidianas y en trabajos ligeros. Solamente en la cama durante el descanso nocturno.
ECOG 2	Síntomas que impiden desempeñar ningún trabajo y obligan al paciente a permanecer en la cama durante el día (no más del 50% del día). Satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.
ECOG 3	Síntomas que obligan al encamamiento más de la mitad del día. Precisa ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria (vestirse o comer).
ECOG 4	Paciente encamado el 100% del día. Precisa necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria.

Tabla 2. Escala funcional de la Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). Adaptado del trabajo de Oken y colaboradores (Oken et al., 1982).

3.2.6. Tratamiento complementario

Mediante las historias clínicas (en formato de papel en las más antiguas y posteriormente a través de Millenium) se documentó retrospectivamente el tratamiento.

Con respecto a la radioterapia, se consideraron y catalogaron los siguientes escenarios:

-Radioterapia 60Gy: El paciente recibió la dosis indicada en el régimen de Stupp.

-Radioterapia holocraneal: Se indicó y completó un régimen holocraneal con dosis inferiores (habitualmente 40Gy), debido generalmente al mal estado funcional del paciente, edad avanzada o enfermedad multicéntrica.

-No completa: El paciente inició el tratamiento, pero no finalizó la pauta indicada por empeoramiento neurológico, complicaciones sistémicas o causas de otra índole.

-No radioterapia: En la serie existen diferentes supuestos que imposibilitaron el inicio del curso de radioterapia. Entre ellas destacan que el tratamiento no se indicó, o no llegó a comenzar debido al empeoramiento clínico tras la intervención o durante el curso terapéutico.

En relación con la quimioterapia recibida, existen multitud de situaciones en la serie, debido a factores como el estado funcional del paciente, la toxicidad farmacológica, progresiones durante el curso de tratamiento o participación del centro en algún ensayo clínico multicéntrico durante el transcurso de los años. El análisis de nuestra serie comienza a partir de 2005, año en el que comienza la denominada “era Stupp”, ya que se protocolizó a nivel internacional el régimen terapéutico con radioterapia y temozolamida debido a los hallazgos del estudio de este autor y sus colaboradores (Stupp et al., 2005). Se agruparon los pacientes en diversas categorías según el curso clínico:

-Stupp: El paciente completó los 6 ciclos de TMZ adyuvante tras la radioquimioterapia concomitante. De forma adicional se incluyeron los pacientes incluidos en el ensayo multicéntrico GEINO 14-01 (Balana et al., 2020), que recibieron 6 ciclos adicionales.

-No completa: El paciente fue propuesto para iniciar el esquema Stupp, pero este se detuvo por diferentes motivos; entre los que destacan el empeoramiento clínico, la progresión radiológica precoz o las toxicidades de diferente tipo inducidas por la TMZ.

-No quimioterapia: El paciente no inició el curso de TMZ por mal estado clínico, rechazo o falta de adherencia.

3.2.7. *Progresión de la enfermedad*

En el curso de la enfermedad de los gliomas de alto grado se objetiva casi universalmente la progresión. Este hecho marcará el fin del intervalo libre de progresión (PFS). Adicionalmente, se registraron los casos de pseudoprogresión. En relación con la progresión de la enfermedad, los casos se codificaron según los supuestos clínicos como sigue:

- Progresión radiológica: Se objetiva progresión en las RM de control sin advertir signos o síntomas atribuibles a este fenómeno.
- Progresión clínica y radiológica: El empeoramiento en la neuroimagen se acompaña de un deterioro clínico atribuible a la progresión.
- No diagnóstico radiológico de progresión: Se agrupan diferentes supuestos bajo esta categoría. En algunos, se asume que existe una progresión clínica sin expresión radiológica, ya que, por ejemplo, en algunos pacientes no se realizó una prueba de imagen por mal estado clínico y en otros, el paciente sufrió un deterioro clínico importante debido a complicaciones de origen neurológico o sistémico sin objetivarse progresión radiológica en la neuroimagen. En un pequeño número de casos, el paciente no había presentado la primera progresión al cerrar el periodo de seguimiento.

El patrón radiológico de la progresión fue igualmente motivo de análisis, ya que tiene implicaciones clave en la elección terapéutica posterior. Debido a que los gliomas de alto

grado tienen una naturaleza infiltrativa y existen múltiples posibilidades de manifestación, los casos se agruparon como se detalla a continuación:

-Local, no elocuente: Recidiva alrededor de la cavidad quirúrgica (no más de 2cm) y que no invade las áreas motora primaria o del lenguaje.

-Recidiva local + invasión área elocuente o afectación tálamo/GGBB/cuerpo calloso:

Vamos a denominar por motivos de simplicidad a esta variable como “Local + invasión elocuente o profunda”. Esta categoría agrupa recidivas alrededor de la cavidad quirúrgica original en las que no se suele indicar una segunda intervención por riesgo elevado de déficit neurológico permanente. Esto ocurre cuando existe afectación por continuidad de estructuras cerebrales de gran elocuencia funcional (tronco encefálico, área motora primaria, área de Broca o Wernicke, ganglios basales, cápsula interna, tálamo...) Se incluyen en este grupo también las neoplasias que presentaron invasión del cuerpo calloso.

-Enfermedad diseminada: Bajo este término se agruparon las recidivas a más de 2 cm de la cavidad postquirúrgica original, multicéntricas, con afectación de ambos hemisferios, en el hemisferio contralateral, o a nivel del neuroeje incluyendo los cuadros de carcinomatosis leptomeníngea. En general, no se indicaron cirugías de rescate en este grupo.

3.2.8. *Tratamiento de la progresión*

El tratamiento de la progresión se determinó en función de variables como el intervalo libre de progresión, el patrón radiológico y el estado funcional medido por la escala ECOG, que también se precisó en el momento del diagnóstico de la recidiva. Así, diferenciamos tres escenarios:

-Reintervención: Las indicaciones para segundas intervenciones no están claramente definidas en la literatura, por lo que, en nuestro centro, se discuten de forma individualizada en el comité multidisciplinar de neurooncología. En general, se han considerado candidatos aquellos pacientes con buen estado funcional que presentan recidivas a nivel local, sin afectación de áreas de alta elocuencia y con un intervalo libre de progresión mayor de 6 meses. En la gran mayoría de los casos, la reintervención fue acompañada de un régimen posterior de quimioterapia de segunda línea cuya elección por parte del oncólogo tratante, se determinó en función de respuesta a tratamientos previos, perfil de toxicidad y factores relativos a la biología molecular del tumor. En algún caso aislado encontramos la situación en la que el paciente, tras el diagnóstico de progresión, inició tratamiento con quimioterapia de segunda línea durante un breve periodo para posteriormente ser reintervenido. En esta situación anecdótica se consideró que la duración del intervalo libre de progresión se extenderá hasta la fecha de la reintervención.

Con la misma metodología que se utilizó en la primointervención, se especificó la fecha en la que se realizó el procedimiento, los asistentes quirúrgicos, las complicaciones postoperatorias, el estado funcional postoperatorio medido por la escala ECOG y el grado de resección basado en una neuroimagen postoperatoria precoz. Mediante el análisis de anatomía patológica se determinó si existía en las muestras tumor viable o cambios post-radioterapia sin hallazgos de tejido tumoral viable. Los factores referentes a la biología molecular del tumor fueron anotados de igual manera si estaban disponibles, analizando si existía algún cambio en relación con el análisis precedente del primer procedimiento.

-Quimioterapia de 2ª línea: Los pacientes candidatos a recibir más tratamiento que presentaban lesiones no susceptibles de resección total iniciaron nuevos esquemas de antineoplásicos. Al igual que en los pacientes reintervenidos, el oncólogo seleccionó el fármaco o fármacos dependiendo de respuestas previas, cuantía del edema cerebral perilesional, perfil de toxicidades en relación con los antecedentes o edad del paciente, participación en algún ensayo clínico multicéntrico u otros. Los diferentes tipos de quimioterapia recibida también se analizaron, entre los que destacan: bevacizumab en monoterapia, nuevos esquemas de TMZ en monoterapia o en combinación con bevacizumab, fotemustina / lomustina en monoterapia o en combinación con bevacizumab, irinotecan y bevacizumab (casos antiguos) o cisplatino e irinotecan (casos antiguos). También fue incluido en este grupo algún caso aislado en el que se indicó la reirradiación seguida de TMZ.

En el contexto de los múltiples esquemas de tratamiento elegidos por el oncólogo tratante a lo largo de los años y con el fin de simplificar la comparación de los grupos, se modelaron las siguientes agrupaciones:

- Temozolamida en monoterapia
- Bevacizumab en monoterapia
- Bevacizumab en combinación
- Nitrosureas (fotemustina o lomustina) en monoterapia

-Sintomático “Best Supportive Care” (BSC): Debido al deterioro clínico, o por rechazo expreso del paciente, se considera al enfermo como candidato a recibir tratamiento sintomático exclusivo.

3.2.9. Segunda progresión: diagnóstico y tratamiento

Los datos adicionales referentes a la progresión tras los tratamientos de segunda línea también se recolectaron con las categorías previamente definidas. Las variables estudiadas son las siguientes: intervalo entre progresiones en meses, tipo de progresión (radiológica o también clínica), patrón radiológico, estado funcional mediante la escala ECOG y tratamiento empleado. El esquema de tratamiento mayoritario en las segundas progresiones consistió principalmente en quimioterapias de 3ª línea (nitrosureas en monoterapia o en combinación con bevacizumab) o soporte sintomático, si la situación clínica del paciente no permitía establecer un régimen de antineoplásicos adicional. En algún caso esporádico se volvió a plantear un tercer procedimiento (segunda reintervención)

3.3. Variables de resultado (outcomes)

Para el análisis de supervivencia y las diferencias entre los diferentes tipos de tratamiento tras la progresión, se evaluó:

-Supervivencia global (OS; *overall survival*): Se determinó mediante la cuantificación del periodo de tiempo transcurrido desde el momento de la primera intervención quirúrgica que confirmó el diagnóstico hasta la fecha de éxitus. La fecha de éxitus se averiguó a través del software *Millenium*, en la plataforma informática del Servicio de Salud de las Islas Baleares (IbSalut) o mediante contacto telefónico directo con el Equipo de Soporte de Atención Domiciliaria (ESAD) para algunos pacientes que se encontraban dentro del programa comunitario de Cuidados Paliativos. En algunos

casos, la fecha exacta de éxitus no pudo obtenerse a través de los medios previamente citados y en esos casos se consideró como 30 días posterior a la última visita registrada por el oncólogo. Los pacientes que continuaban vivos a fecha de 31.12.2021 se censuraron para el análisis, de la misma manera que los pacientes perdidos en el seguimiento.

-Intervalo libre de progresión (PFS; *progression-free survival*): Periodo de tiempo transcurrido desde la intervención diagnóstica hasta la RM en la que se objetiva progresión de la enfermedad mediante criterios RANO, (Wen et al., 2010) o criterios de McDonald en los pacientes más antiguos de la serie, (Macdonald et al., 1990). Los pacientes en los que sospechó un fenómeno de pseudoprogresión fueron manejados con neuroimagen anatómica multimodal y metabólica de control y continuación del esquema con TMZ. El intervalo libre de progresión se calculó hasta que la progresión radiológica fue considerada definitiva.

-Supervivencia tras la progresión (PPS; *post-progression survival*): Diferencia expresada en meses entre la fecha de éxitus y la fecha del diagnóstico de la progresión.

3.4. Análisis estadístico

Vamos a considerar dos apartados bien diferenciados: un primer apartado de estadística descriptiva, en la que se exponen las características de la serie; y una segunda

parte de estadística inferencial, en la que pretendió inferir conclusiones y tendencias a partir de datos obtenidos de una muestra (Flores-Ruiz et al., 2017).

3.4.1. Estadística descriptiva

En el apartado de estadística descriptiva, las variables categóricas como el sexo o tipo de tratamiento, se expresaron como frecuencias y porcentajes, mientras que las variables cuantitativas continuas, como edad o tiempos de supervivencia en meses, fueron reflejadas a través de medianas y rangos. Se realizó de forma independiente la descriptiva de los pacientes tratados mediante biopsia frente a los de intención radical.

3.4.2. Comparación de grupos

Con respecto a la estadística inferencial, la prueba estadística empleada para la comparación de grupos se modificó en función de si la variable seguía una distribución normal, aplicando previamente pruebas de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov por la extensión de la serie). De igual modo, el test estadístico varió en función de la naturaleza de la variable (cuantitativa continua versus cualitativa) y de los grupos que se deseaban comparar (2 o más de 2). De esta manera, en la comparación de dos grupos se utilizó:

- T de Student para la comparación paramétrica de variables cuantitativas
- U-de Mann Whitney para la comparación no paramétrica de variables cuantitativas
- Chi cuadrado para la comparación de variables cualitativas

Sin embargo, para la comparación de más de dos grupos:

- ANOVA de 1 vía para la comparación paramétrica de variables cuantitativas

-Kruskal-Wallis para la comparación no paramétrica de variables cuantitativas

-Chi cuadrado para la comparación de variables cualitativas

3.4.3. *Análisis de supervivencia*

En el análisis de supervivencia, el método de Kaplan-Meier supone un instrumento estadístico no paramétrico utilizado ampliamente para este propósito, ya que permite una visualización gráfica (mediante las curvas de Kaplan-Meier) del análisis del conjunto de individuos a lo largo del tiempo, hasta que se produce un determinado evento. Este método estadístico permite el manejo de datos censurados, sin descartarlos. En nuestro estudio, los casos censurados son aquellos que se perdieron o continúan vivos en el momento de finalizar el periodo de seguimiento del estudio. El test de rango logarítmico o log-rank está basado en la metodología Kaplan-Meier (Jager et al., 2008) y se utilizó para la comparación de dos o más grupos.

3.4.4. *Regresión logística de Cox*

Podríamos definir las curvas de riesgo como antagónicas a las curvas de supervivencia, ya que suponen la representación gráfica de una función de riesgo, definida como la probabilidad de que ocurra el suceso a estudio por unidad de tiempo. La regresión de Cox intenta establecer la relación de una variable (ya sea categórica o cuantitativa continua) con la función de riesgo a lo largo del tiempo, siendo, por tanto, diferente de una regresión logística que analiza los eventos en un momento determinado. El instrumento fundamental de las regresiones de Cox es la Hazard Ratio (HR), o razón de riesgo, que define la relación que existe entre las curvas de riesgo. Las HR tienen en cuenta el tiempo en el que se producen los eventos (a diferencia de la Odds Ratio, que evalúa el riesgo en un momento determinado).

Para evaluar el impacto que tenían las variables recopiladas en los eventos a estudio se utilizaron inicialmente modelos de regresión de Cox univariantes. Así, se seleccionaron las variables más significativamente implicadas en la función de riesgo para posteriormente utilizar modelos de regresión de Cox multivariantes. Esta herramienta estadística intenta explorar de forma simultánea la relación de diferentes factores de riesgo y un determinado evento (por ejemplo, en nuestro caso la progresión de la enfermedad o el fallecimiento del paciente) para identificar posibles variables de confusión o fenómenos de interacción estadística (Wakkee et al., 2014). El HR se expresó mediante intervalos de confianza del 95%, considerándolo no significativo si incluía el valor 1 (curvas idénticas). Los valores $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Aunque las regresiones de Cox clásicas evalúan el riesgo que tiene una determinada variable para producir un evento a lo largo del tiempo, estas separan los distintos grupos a comparar (en nuestro caso, reintervención frente a tratamiento sistémico) sabiendo previamente a qué grupo corresponde cada paciente. Debido a que es probable que este hecho produzca sesgos, el primer artículo de la tesis utiliza de forma adicional modelos de regresión de Cox con variables tiempo-dependientes, que van a considerar al inicio del seguimiento a todos los pacientes dentro del grupo control (no reintervenidos) y únicamente pertenecientes al grupo de reintervención a partir del momento en el que se toma la decisión y se realiza el procedimiento (Fisher & Lin, 1999) . De esta manera se intenta valorar si el momento en que se realiza la reintervención influye de manera significativa en el impacto pronóstico de la misma.

El software estadístico utilizado para generar la matriz de datos y el análisis matemático fue el SPSS versión 22.0 (*Statistical Package for Social Sciences; IBM, Armonk, NY*).

4. RESULTADOS

4.1. Descripción general de la serie

Entre el 01.01.2005 y el 31.12.2019 se obtuvo el registro de 427 pacientes intervenidos con diagnóstico histopatológico de gliomas de alto grado. De ellos, en 179 casos (41.9%) se planteó una biopsia diagnóstica y en 248 (58.1%) se optó por una intención radical de la lesión. Los diagnósticos histológicos obtenidos en la primera intervención (ya fuese mediante biopsia o resección) se encuentran representados en la siguiente tabla:

Diagnóstico	Número de casos	Porcentaje
Glioblastoma	338	79.2%
Gliosarcoma	12	2.8%
Astrocitoma anaplásico	55	13.1%
Oligodendroglioma anaplásico	13	3.0%
Oligoastrocitoma anaplásico	8	1.9%
TOTAL	427	100%

Tabla 3. Diagnósticos histológicos de la serie (n=427) según la clasificación de la OMS de 2007 (Louis et al., 2007).

Como puede apreciarse, los diagnósticos correspondientes al grado IV de la OMS son mucho más prevalentes (350 casos, 82%), siendo el glioblastoma (incluyendo sus subtipos histológicos) el tumor más frecuentemente diagnosticado. Se obtuvo un resultado histológico compatible con grado III de la OMS en 77 casos (18%), siendo, el astrocitoma anaplásico, la lesión más comúnmente diagnosticada.

Para iniciar el análisis correspondiente a la estadística descriptiva, comentaremos las características demográficas de los pacientes en función de si se obtuvo un diagnóstico histológico de grado III o IV.

- Grado IV de la OMS: La mediana de edad se situó en 62 años (rango 7-85), siendo más frecuente este diagnóstico en hombres (207 casos, 59.1%) que en mujeres (143 casos, 40.9%). La mediana de edad en pacientes a los que se practicó resección fue de 61 años, mientras que la mediana de edad en los casos que recibieron una biopsia fue 63. La diferencia de edad no fue estadísticamente significativa con referencia al tipo de tratamiento (prueba U de Mann-Whitney, $p=0.173$).

- Grado III de la OMS: En estos casos, la mediana de edad al diagnóstico resultó ser inferior, 54 años (rango 14-82). También fue más frecuente en pacientes del sexo masculino (50 casos, 64.9%) que en mujeres (27 casos, 35.1%). Con respecto al procedimiento quirúrgico utilizado, la mediana de edad en pacientes en los que se indicó una resección fue inferior (45.5 años) al grupo de biopsias (61 años), con diferencias significativas (prueba U de Mann-Whitney, $p<0.001$). Al aplicar de nuevo el test estadístico U de Mann-Whitney para valorar la diferencia de edad entre grupos en referencia al grado histológico, este resulta estadísticamente significativo ($p<0.001$).

Analizaremos por separado las variables a estudio en los pacientes con diagnóstico de gliomas pertenecientes al grado IV o al grado III de la OMS, por considerarse poblaciones diferentes en términos de demografía, respuesta a tratamientos y supervivencia. Por otro lado,

considerar a los gliomas de alto grado como una entidad homogénea, independientemente de su grado histológico, supone un motivo de exclusión en meta-análisis y revisiones sistemáticas recientes.

4.2. Estadística descriptiva sobre los gliomas grado IV de la OMS

- Síntomas: Las manifestaciones clínicas que con mayor frecuencia llevaron al diagnóstico fueron de tipo cognitivo o conductual, seguidas de déficit motor, cefalea, crisis epilépticas y trastorno del lenguaje. La siguiente tabla recoge las variables clínicas que motivaron la búsqueda de atención médica en orden descendente.

Síntoma	Número de casos	Porcentaje
Cognitivo/Conductual	81	23.1%
Déficit motor	78	22.3%
Cefalea/vómitos	55	15.7%
Crisis epilépticas	53	15.1%
Alteración del lenguaje	52	14.9%
Alteración visual	11	3.1%
Alteración sensitiva	9	2.6%
Disminución nivel conciencia	5	1.4%
Síndrome general	5	1.4%
Clínica cerebelosa	1	0.3%
TOTAL	350	100%

Tabla 4. Manifestaciones clínicas en los pacientes con tumores grado IV de la OMS (n=350)

- Localización: En casi un 25% de los casos, el asentamiento de la lesión tuvo lugar en el lóbulo temporal, seguido de la afectación de más de un lóbulo. La afectación frontal y parietal le siguen en frecuencia, como puede observarse en la tabla 5. Debe

tenerse en cuenta la agregación de la categoría “Central” por motivos de intención de tratamiento recogida en 14 casos (4%), ya que la localización perirrolándica motivó en algunos casos la realización de biopsia, debido al alto riesgo de déficit motor permanente postoperatorio. Desde el punto de vista estrictamente anatómico, estas lesiones deberían catalogarse como “Frontal”, “Parietal” o “Multilobar”, dependiendo de la localización. Con respecto a la lateralización, la incidencia de lesiones en el lado derecho (169 casos, 48.3% fue ligeramente mayor que en el izquierdo (146 casos, 41.7%). En 24 casos (6.8%) se observó que la lesión invadía las estructuras de la línea media y en 11 (3.2%) que existía afectación simultánea de ambos hemisferios sin evidencia radiológica al diagnóstico de invasión de las comisuras interhemisféricas.

Localización	Número de casos	Porcentaje
Temporal	86	24.6%
Multilobar	80	22.9%
Frontal	68	19.4%
Parietal	46	13.1%
Afectación línea media	22	6.3%
Afect GGBB/Cáspula/Tálamo	18	5.1%
Central	14	4.0%
Insular	6	1.7%
Tronco/Fosa posterior	5	1.4%
Occipital	3	0.9%
Intraventricular	2	0.6%
TOTAL	350	100%

Tabla 5. Localización anatómica de las lesiones de grado IV (n=350).

- Tipo de tratamiento quirúrgico: En relación con la intención de tratamiento, se realizaron 214 resecciones (61.1%) y 136 biopsias (38.9%). Con respecto a estas

últimas, se realizaron 74 procedimientos a cielo abierto (54.4%), ya fuese mediante trépano o craneotomía y 62 biopsias (45.6%) empleando técnicas estereotácticas mediante el uso de marco o dispositivos de neuronavegación.

La indicación de biopsia como tratamiento inicial obedeció más a factores relacionados con la localización de la lesión que a circunstancias propias del paciente, como puede advertirse en la siguiente tabla. En un caso de la serie desconocemos la motivación (el intento de resección total parecía factible).

Motivo biopsia	Número de casos	Porcentaje
Lesión multilobar/multicéntrica	67	49.3%
Área elocuente	32	23.5%
Afect. GGBB/Tálamo/Cápsula	30	22.1%
Comorbilidad/edad avanzada	4	2.9%
Desconocido	1	0.7%
TOTAL	136	100%

Tabla 6. Indicaciones de biopsia diagnóstica en los pacientes con tumores grado IV de la OMS (n=350)

-Volumen lesional: Únicamente se determinó el volumen de la lesión mediante el método $\frac{a \cdot b \cdot c}{2}$ en los intentos de resección total. Debido a la imposibilidad de analizar las pruebas de imagen en algunos de los casos más antiguos de la serie, la estimación del volumen lesional se obtuvo en 206 casos (96.3%). La mediana obtenida fue de 24.25 cm³ (1.1-141.3 cm³). Se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución de nuestros datos, concluyéndose que deberán utilizarse pruebas no paramétricas para analizar esta variable (test K-S; p=0.000), resultado concordante con los valores de los estadísticos de distribución (asimetría: 1.26, curtosis: 1.51).

-Datos histopatológicos: Debe tenerse en cuenta que esta serie comporta 15 años de análisis, por lo que, especialmente al comienzo de la serie, algunos estudios moleculares no formaban parte de la caracterización rutinaria de los tumores o no estaban disponibles en nuestro centro.

- p53: Se obtuvo la información sobre la mutación *p53* mediante estudios de inmunohistoquímica en 170 de 350 casos (48.5%). De ellos, los estudios negativos o con tinción inmunohistoquímica débil (inferior al 10%) fueron más frecuentes (97 casos, 57.0%) que los positivos (73 casos, 43.0%).
- Ki67: El valor porcentual de Ki67 (MIB-1) estaba presente en 201 informes de anatomía patológica (57.4%). La mediana obtenida fue del 25% (2-85%). Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov se concluyó que su distribución no era normal ($p=0.000$).
- Mutación IDH-1: Disponible en 143/350 muestras de tumores (40.9%), ya que antes del año 2014 no se realizaba de forma rutinaria. Se observa que los tumores IDH-wildtype son mucho más frecuentes que los que presentan mutación *IDH-1* (137 casos, 95.8%; frente a 6 casos, 4.2%).
- Grado de metilación del promotor MGMT: La determinación por pirosecuenciación se comenzó a realizar de forma esporádica a

partir del año 2014 y se incluyó como parte de análisis rutinario en 2018. Es por ello que la información está disponible en 73/350 casos (20.8%), siendo más frecuentes los tumores que no presentaban el promotor metilado (promedio de metilación de las secuencias analizadas inferior al 9%) que los que presentaban una metilación intermedia o hipermetilación (47 casos, 64.4%; frente a 26 casos, 35.6%).

- Amplificación EGFR: Definida mediante técnicas de hibridación fluorescente in situ en 115/350 pacientes (32.8%). Fueron más frecuentes los tumores que no presentaban amplificación del gen (73 casos, 63.5%) que los que manifestaban esta característica (42 casos, 36.5%).

- Grado de resección postoperatoria: Evaluado mediante neuroimagen postoperatoria precoz (mayoritariamente RM con contraste) en las cirugías resectivas. De los 214 procedimientos, se evidenció la resección total (GTR) en 142 casos (66.3%), resección parcial máxima (estimada como mayor al 90% del volumen lesional original) en 41 casos (19.1%) y resección parcial en 19 casos (8.9%). En 12 casos (5.6%) no se practicó ninguna imagen postoperatoria con contraste y la resección no pudo ser examinada.

- Asistentes quirúrgicos: Especificados en los procedimientos resectivos (aunque muchas biopsias estereotácticas y a cielo abierto se realizaron en condiciones de

neuronavegación). Cabe destacar que la disponibilidad de estas herramientas fue aumentando con el paso de los años y que existe la posibilidad de utilizar varios instrumentos, fármacos o técnicas de forma simultánea; y por ello los analizaremos por separado. El asistente quirúrgico mayormente utilizado fue el neuronavegador (91 casos, 42.5%). Puesto que la utilización de la RM intraoperatoria (empleada en 43 casos, 20.1%) incluye su propio sistema de navegación, podemos afirmar que el cirujano estuvo asistido por la neuronavegación en 134/214 casos (62.6%). La administración preoperatoria de 5-ALA se determinó en 63/214 casos (29.5%). En 2 casos (0.9%) se utilizaron técnicas de mapeo intraoperatorio del lenguaje con el paciente despierto. En 74 casos (34.5%), el informe quirúrgico no describía el uso de ninguna de las técnicas previamente citadas.

- Complicaciones postoperatorias: En 229 de 350 procedimientos (65.4%) no se registró ninguna complicación. Las complicaciones de grado I se contabilizaron en 76/350 casos (21.7%). En 18/350 casos (5.0%) se sucedieron complicaciones grado II, requiriendo un procedimiento invasivo para su manejo. En 17/350 casos (5.0%) las complicaciones postoperatorias motivaron el ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos. En 10 casos (2.9%) se produjo la muerte del paciente como consecuencia directa de la intervención (complicación grado IV).

Si segmentamos el número de complicaciones por procedimiento (resecciones vs biopsias), observamos en la tabla de contingencia que los distintos tipos de complicaciones se mantienen razonablemente estables.

Al aplicar el test χ^2 para la comparación de grupos, se concluye que en nuestra serie no existen diferencias estadísticamente significativas en las complicaciones para los diferentes tipos de intervenciones ($p=0.181$).

Complicaciones	Resecciones	Biopsias	TOTAL
Ninguna	132 (61.7%)	97 (71.3%)	229 (65.5%)
Grado I	53 (24.8%)	23 (16.9%)	76 (21.8%)
Grado II	12 (5.6%)	6 (4.4%)	18 (5.0%)
Grado III	12 (5.6%)	5 (3.7%)	17 (4.8%)
Grado IV	5 (2.3%)	5 (3.7%)	10 (2.9%)
TOTAL	214 (100%)	136 (100%)	350 (100%)

Tabla 7. Complicaciones postquirúrgicas de los pacientes afectados de gliomas grado IV de la OMS (n=350) definidas por la clasificación de Landriel-Ibáñez (Ibáñez et al., 2011).

-Estado funcional tras la intervención: Las valoraciones según la escala ECOG una vez finalizado el ingreso hospitalario (en algunos casos antiguos de la serie se estimaron por los datos de la historia clínica) fueron las siguientes. Paciente asintomático (ECOG 0; 47 casos, 13.4%), síntomas leves (ECOG 1; 143 casos, 40.9%), síntomas moderados (ECOG 2; 107 casos, 30.6%); síntomas limitantes (ECOG 3; 37 casos, 10.6%), paciente completamente encamado y dependiente (ECOG 4; 6 casos, 1.7%); éxitus tras el ingreso (ECOG 5; 10 casos, 2.9%). En la siguiente tabla de contingencia podemos observar las valoraciones funcionales postoperatorias en función del tipo de procedimiento. Parece que las puntuaciones en la escala ECOG obtenidas tras el ingreso hospitalario son más altas tras las biopsias diagnósticas en comparación con las cirugías con intención radical. Al aplicar el test χ^2 se concluye que en nuestra serie existen diferencias significativas entre el estado funcional postoperatorio del enfermo y el tipo de procedimiento ($p<0.001$).

Valoración funcional	Resecciones	Biopsias	TOTAL
ECOG 0	38 (17.8%)	9 (6.6%)	47 (13.4%)
ECOG 1	103 (48.1%)	40 (29.4%)	143 (40.9%)
ECOG 2	56 (26.2%)	51 (37.5%)	107 (30.6%)
ECOG 3	11 (5.1%)	26 (19.1%)	37 (10.6%)
ECOG 4	1 (0.5%)	5 (3.7%)	6 (1.7%)
ECOG 5 (éxitus)	5 (2.3%)	5 (3.7%)	10 (2.9%)
TOTAL	214 (100%)	136 (100%)	350 (100%)

Tabla 8. Valoración funcional según la escala ECOG tras la primointervención en pacientes con gliomas grado IV de la OMS (n=350).

-Radioterapia postoperatoria: 222 pacientes (63.4%) recibieron la dosis objetivo total de 60 Gy incluida en el régimen de Stupp. 24 pacientes (6.9%) fueron propuestos a recibir un régimen de radioterapia holocraneal por la extensión de su enfermedad con una dosis total de 40 Gy para evitar riesgo de toxicidad, o bien fueron tratados con un régimen de radioterapia hipofraccionada con la misma dosis total debido a edad avanzada o peor estado funcional. En 23 casos (6.6%) no se finalizó el régimen de radioterapia propuesto debido a empeoramiento neurológico u otras complicaciones. En 63 pacientes (18.0%) no se indicó el tratamiento por diferentes motivos clínicos y la radioterapia se realizó en otro centro a petición expresa del paciente en aproximadamente el 5% de los casos. Al separar los pacientes en función del tipo de procedimiento, puede advertirse que los pacientes que recibieron una dosis total de 60 Gy pertenecen en su mayoría al grupo de pacientes en los que se intentó una resección radical de su lesión. Los pacientes a los que se les practicó una biopsia mostraron tasas más altas de regímenes de radioterapia distintos al estándar o de no indicación de tratamiento. El resultado del test χ^2 concluye que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.001$).

Radioterapia	Resecciones	Biopsias	TOTAL
60 Gy	164 (76.6%)	58 (42.6%)	222 (63.4%)
Holoc. / Hipo. (40Gy)	8 (3.8%)	16 (11.8%)	24 (6.9%)
Stop	11 (5.1%)	12 (8.8%)	23 (6.6%)
No radioterapia	24 (11.2%)	39 (28.7%)	63 (18.0%)
Otro centro	7 (3.3%)	11 (8.1%)	18 (5.1%)
TOTAL	214 (100%)	136 (100%)	350 (100%)

Tabla 9: Dosis de radioterapia recibida por los pacientes afectados de gliomas grado IV de la OMS (n=350). Holoc: radioterapia holocraneal Hipo: radioterapia hipofraccionada.

-Quimioterapia postoperatoria: En 93 casos se objetivó la compleción de tratamiento con al menos 6 ciclos de temozolamida adyuvante (26.6%). En 145/350 casos (41.4%) el paciente inició el esquema Stupp, pero no lo finalizó (en general, no completó la fase de adyuvancia) debido a progresión de la enfermedad o toxicidades derivadas de la quimioterapia. 86 pacientes (24.6%) no recibieron quimioterapia en nuestro centro, debido a mal estado clínico o perfil de toxicidades. Al segregar los grupos en función del procedimiento utilizado, puede contemplarse como la compleción del régimen de Stupp fue mucho más frecuente en pacientes sometidos a una cirugía con intención radical y que el porcentaje de pacientes no tratados con quimioterapia fue mayor en el grupo de biopsias. El test χ^2 de nuevo sugiere que existen diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.001$).

Quimioterapia	Resecciones	Biopsias	TOTAL
Finaliza Stupp	78 (36.4%)	15 (11.0%)	93 (26.6%)
Stop quimioterapia	87 (40.7%)	58 (42.6%)	145 (41.4%)
No quimioterapia	36 (16.8%)	50 (36.7%)	86 (24.6%)
Otro centro	13 (6.1%)	13 (9.6%)	26 (7.4%)
TOTAL	214 (100%)	136 (100%)	350 (100%)

Tabla 10. Grado de cumplimiento del esquema Stupp en pacientes con gliomas grado IV de la OMS (n=350) (Stupp et al., 2005)

- Progresión de la enfermedad: Durante la evolución, se observaron cambios en las RM de control atribuibles a fenómenos de pseudoprogresión en 71/350 casos (20.3%), siendo mucho más frecuentes en el grupo de pacientes intervenidos para exéresis que en los biopsiados (62 frente a 9 casos, test χ^2 $p < 0.001$). En el diagnóstico de progresión, la situación más frecuente fue la evidencia en las pruebas de neuroimagen acompañada de síntomas clínicos atribuibles (168 casos, 48.0%). La progresión únicamente radiológica se evidenció en 59 casos (16.9%). En total, se evidenció la progresión de la enfermedad mediante pruebas de neuroimagen en 227/350 casos (64.9%). En el resto de casos, no se obtuvo un diagnóstico certero de progresión mediante pruebas complementarias; en 106 casos (30.3%) se produjo una progresión clínica sin confirmación radiológica, 13 pacientes (3.7%) se perdieron en el seguimiento, y por último, los 4 pacientes restantes (1.1%) continuaban vivos sin evidencia de progresión a fecha de 31.12.2021. De nuevo, al dividir al grupo en función del procedimiento, se observan diferencias estadísticamente significativas (test χ^2 , $p < 0.001$). La evidencia de progresión sólo radiológica fue más frecuente en el grupo de intención radical de tratamiento.

Progresión	Resecciones	Biopsias	TOTAL
Radiológica	52 (24.3%)	7 (5.1%)	59 (16.9%)
Clínica y radiológica	114 (53.3%)	54 (39.7%)	168 (48.0%)
Clínica (no neuroimagen)	38 (17.8%)	68 (50.0%)	106 (30.3%)
Perdido en el seguimiento	7 (3.3%)	6 (4.4%)	13 (3.7%)
Ausencia de progresión (vivo)	3 (1.4%)	1 (0.7%)	4 (1.1%)
TOTAL	214 (100%)	136 (100%)	350 (100%)

Tabla 11. Escenarios clínicos en el diagnóstico de progresión de los gliomas grado IV de la OMS (n=350).

- Patrón radiológico de progresión: De los 227 casos en los que se obtuvo una confirmación radiológica de progresión tumoral, se evidenció una recidiva o progresión local acompañada de invasión de zonas de alta elocuencia o afectación de los ganglios basales, tálamo, cápsula interna o estructuras troncoencefálicas en 116 pacientes (51.1%). 71 pacientes (31.3%) experimentaron una recidiva o progresión local sin afectar a áreas de alta elocuencia. Los 40 casos restantes (17.6%) se catalogaron como patrón de progresión diseminado. Si separamos los pacientes en función del procedimiento quirúrgico indicado, se aprecian de nuevo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (test χ^2 , $p < 0.001$). Las progresiones con patrón local sin afectación de áreas elocuentes fueron más frecuentes en pacientes sometidos a cirugías resectivas, mientras que la afectación de estructuras profundas o elocuentes, o progresiones catalogadas como “enfermedad diseminada”, más frecuentes en el grupo de biopsias. Este resultado confirma de nuevo que la indicación de cirugía o biopsia se fundamentó en aspectos relacionados con la localización de la lesión.

Patrón progresión	Resecciones	Biopsias	TOTAL
Local, no elocuente	68 (41.0%)	3 (4.9%)	71 (31.3%)
Local elocuente o profunda	77 (46.4%)	39 (63.9%)	116 (51.1%)
Enfermedad diseminada	21 (12.7%)	19 (31.1%)	40 (17.6%)
TOTAL	166 (100%)	61 (100%)	227 (100%)

Tabla 12. Patrón radiológico de la recidiva de la enfermedad en gliomas de grado IV de la OMS (n=227).

- Tratamiento de la progresión: El tratamiento más empleado en los 227 pacientes diagnosticados de recidiva tumoral o progresión de la enfermedad fueron las quimioterapias de segunda línea (115 casos, 50.7%). En 33 casos (14.5%) se indicó

una segunda intervención generalmente seguida de nuevos esquemas de quimioterapia. Podemos concluir que en 148 casos (65.2%) se indicó un tratamiento quirúrgico o sistémico de la progresión. En los restantes 79 casos (34.8%) no se indicó ningún tratamiento oncológico y se recomendó el soporte sintomático de forma exclusiva. Existen diferencias significativas en la terapéutica empleada en la progresión, en el grupo de pacientes intervenidos en comparación al grupo de los biopsiados (test χ^2 , $p < 0.001$). Del mismo modo, no se indicó ninguna cirugía de rescate y se interrumpió el tratamiento oncológico activo con mayor frecuencia en el grupo de pacientes sometidos a biopsia.

Tratamiento progresión	Resecciones	Biopsias	TOTAL
Reintervención +/- QMT	33 (19.9%)	0 (0%)	33 (14.5%)
QMT 2ª línea	84 (50.6%)	31 (50.8%)	115 (50.7%)
Sintomático (BSC)	49 (29.5%)	30 (49.2%)	79 (34.8%)
TOTAL	166 (100%)	61 (100%)	227 (100%)

Tabla 13. Tipo de tratamiento en la progresión de la enfermedad de los gliomas grado IV (n=227). En amarillo se destacan los grupos a comparar: reintervención frente a tratamiento sistémico en pacientes que recibieron una resección inicialmente.

Con el fin de homogenizar los grupos a la hora de evaluar el impacto pronóstico de la reintervención en términos de supervivencia, se eliminarán del análisis los pacientes diagnosticados mediante biopsia y los no tratados activamente en la progresión. Los grupos objetivo a comparar serán, por tanto, “Reintervención” (n=33) y “Quimioterapia” (n=84).

-Reintervenciones: De los 33 pacientes reintervenidos de gliomas grado IV de la OMS se confirmó el diagnóstico histopatológico de glioblastoma en 32 casos (97.0%). En un caso (3.0%) no se observó ningún área tumoral viable y el diagnóstico fue compatible con radionecrosis. Con respecto a los asistentes quirúrgicos empleados por el neurocirujano, de nuevo, el dispositivo de neuronavegación S7 de Medtronic fue el más empleado (21 casos, 63.6%). En 5 casos (15.1%) se utilizó la RM intraoperatoria. Por ello, en 26 casos (78.7%), el facultativo estuvo asistido por un sistema de localización intraoperatoria. La administración preoperatoria de 5-ALA se registró en 17 casos (51.7%), generalmente en combinación con técnicas de navegación. En 7 casos (21.2%), el informe quirúrgico no describía el uso de ninguna de estas técnicas. En relación con las complicaciones postoperatorias, en la mayoría de los casos no se registró ningún efecto adverso en relación con el procedimiento (22 casos, 66.7%). Ocho pacientes (24.2%) sufrieron complicaciones grado I según la clasificación de Landiel-Ibáñez (Ibáñez et al., 2011). En 3 casos (9.1%) las complicaciones se catalogaron como grado II. No se produjo ningún éxito (complicación grado IV) en relación con segundas intervenciones. En la mayor parte de los pacientes se obtuvo una resección macroscópica total de la lesión (29 casos, 87.9%). La resección se catalogó como parcial máxima en 2 casos (6.1%, resto tumoral con volumen estimado inferior al 10% de la recidiva original). En 2 casos (6.1%) la resección no pudo valorarse al no disponer de una neuroimagen postoperatoria con contraste. El estado funcional según la escala ECOG se valoró también tras la segunda intervención; la mayor parte de los enfermos presentaban valores de 1 o 2 en dicha escala. [ECOG 0: 3 casos (9.1%), ECOG 1: 16 casos (48.5%), ECOG 2: 11 casos (33.3%), ECOG 3: 3 casos (9.1%)]

Reintervenciones				
Anat.Patológica	32 Glioblastoma (97.0%)	1 Radionecrosis (3.0%)		
Asistentes	21 Navegador (63.6%)	16 5-ALA (51.5%)	5 RMi (15.1%)	7 Ninguno (22.0%)
Resección	29 Total (87.9%)	2 Parcial máx. (6.1%)	2 No val. (6.1%)	
Complicaciones	22 Ninguna (66.7%)	8 Grado I (24.2%)	3 Grado II (9.1%)	
ECOG	3 ECOG 0 (9.1%)	16 ECOG 1 (48.5%)	11 ECOG 2 (33.3%)	3 ECOG 3 (9.1%)

Tabla 14. Estadística descriptiva perteneciente al grupo de reintervenidos de gliomas grado IV de la OMS (n=33).

-Segundas líneas de quimioterapia: En 148 pacientes se trató activamente la progresión, de los que 142 recibieron segundos esquemas de tratamiento sistémico. Debido a que no existe un régimen de quimioterapia estándar en las recidivas o progresiones de la enfermedad, las variables a estudio aumentan, ya que, dependiendo de las características del paciente, existe la posibilidad de administrar diferentes fármacos en monoterapia o en combinación. De forma general, el bevacizumab es el fármaco más empleado (106 casos, 74.6%), ya sea en monoterapia (63 casos) o en combinación con otro antineoplásico (43 casos). Las nitrosureas como lomustina o fotemustina se emplearon en 37 casos (26.0%), mayoritariamente en combinación (26 casos). En 25 casos (17.6%), se optó por un nuevo esquema de temozolamida, generalmente en monoterapia (24 casos). Por último, se registra el tratamiento con irinotecan en 17 casos (11.9%), casi siempre en combinación con bevacizumab (16 casos). Desglosaremos los casos de progresión según corresponda al grupo de pacientes diagnosticados por biopsia y tratados con radio y quimioterapia posterior (n=31), al grupo de pacientes tratados en el momento del diagnóstico con

cirugía exéretica seguida de radio y quimioterapia y reintervenidos en la progresión (n=33), o al grupo de pacientes tratados en el momento del diagnóstico con cirugía exéretica seguida de radio y quimioterapia, en los que se desestimó el rescate quirúrgico y se indicó tratamiento sistémico en la progresión (n=84).

- Pacientes diagnosticados por biopsia: El fármaco más utilizado fue el bevacizumab (27 casos, 81.8%).

- Pacientes reintervenidos en la progresión: De los 33 pacientes reintervenidos, 6 de ellos (18.2%) no recibieron ningún tratamiento de quimioterapia adicional debido al deterioro clínico u otros factores. La temozolamida fue el fármaco más utilizado en la progresión (15 casos, 45.4%), generalmente en monoterapia (14 casos 42.4%). Le sigue en frecuencia el bevacizumab (8 casos, 24.2%), administrado en monoterapia (4 casos, 12.1%), en combinación con irinotecan (2 casos, 6.1%), TMZ (1 caso, 3%) o nitrosureas (1 caso, 3%). 4 pacientes (12.1%) recibieron fotemustina o lomustina en monoterapia y en un caso (3%) se indicó el tratamiento con cisplatino e irinotecan.

- Pacientes intervenidos en el diagnóstico y desestimados para reintervención en la progresión: El bevacizumab vuelve a ser el fármaco mayormente empleado (71 casos, 84.5%). Su uso en monoterapia (39 casos, 46.4%) es más frecuente que en combinación con nitrosureas (22 casos, 26.2%) o irinotecan (10 casos, 11.9%). La temozolamida en

monoterapia es el tratamiento indicado en 9 pacientes (10.7%). Por último, 4 pacientes (4.8%) fueron tratados con fotemustina o lomustina en monoterapia.

- Segundas progresiones: Tras el tratamiento activo de la primera recaída (148 casos), algunos pacientes se diagnosticaron de una segunda progresión o recidiva de la enfermedad. La situación más frecuente fue la de hallazgos sugestivos de progresión en la neuroimagen acompañada de síntomas atribuibles (87 casos, 58.8%), mientras que la progresión únicamente radiológica se observó en 20 pacientes (13.5%). Se concluye por tanto que una segunda progresión se determinó mediante pruebas complementarias en 107 casos. Únicamente en 17 casos (15.9%) la progresión se catalogó como local, no elocuente. En el resto de pacientes (90 casos, 84.1%), la enfermedad había invadido estructuras de alta elocuencia, profundas, o se etiquetó como “enfermedad diseminada”.

En 33 casos (22.3%), el diagnóstico de la progresión fue clínico. Tres pacientes (2.1%) se perdieron durante el seguimiento tras haber comenzado con esquemas de quimioterapia de 2ª línea y los 5 pacientes restantes (3.4%) continuaban vivos al final de periodo de seguimiento (31.12.2021).

- Tratamiento de la segunda progresión: Tras el hallazgo de la segunda progresión (140 pacientes), ésta se trató de forma activa en 50 casos (35.8%), mientras que en 90 pacientes (64.2%) recibieron exclusivamente tratamiento sintomático. La totalidad de los pacientes tratados recibieron quimioterapias de 3ª línea. Los esquemas quincenales con antiangiogénicos en monoterapia, en combinación con nitrosureas o

con irinotecan fueron de nuevo las estrategias más utilizadas. En algunos casos se administró fotemustina o lomustina en monoterapia o temozolamida en monoterapia.

4.3. Análisis de supervivencia comparativo entre resecciones y biopsias en gliomas de grado IV de la OMS

Estudiaremos por separado el resultado de las tres variables resultado (*endopints*) a estudio. En la fecha de cierre del seguimiento (31.12.2021) la mayoría de pacientes habían fallecido (322 casos, 92.0%). Los 28 casos restantes (8.0%) se consideraron censurados; ya que 11 (3.1%) continuaban vivos al final del seguimiento y 17 (4.9%) se perdieron.

- OS: La mediana de supervivencia global de la serie es de 10 meses (IC95% 8.5-11.4). Si estratificamos los pacientes según el procedimiento propuesto se advierte que la cifra de supervivencia global es mayor en el grupo de pacientes intervenidos con intención radical. [Resecciones: 15 meses, IC95% (13.4-16.5)]; [Biopsias: 5 meses, IC95% 4.1-5.8)] con significancia estadística (test log-rank, p<0.001).

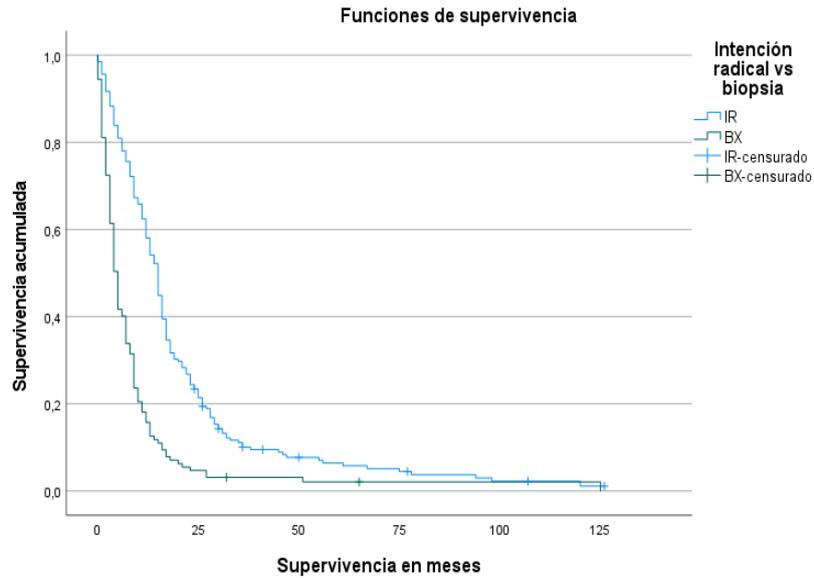
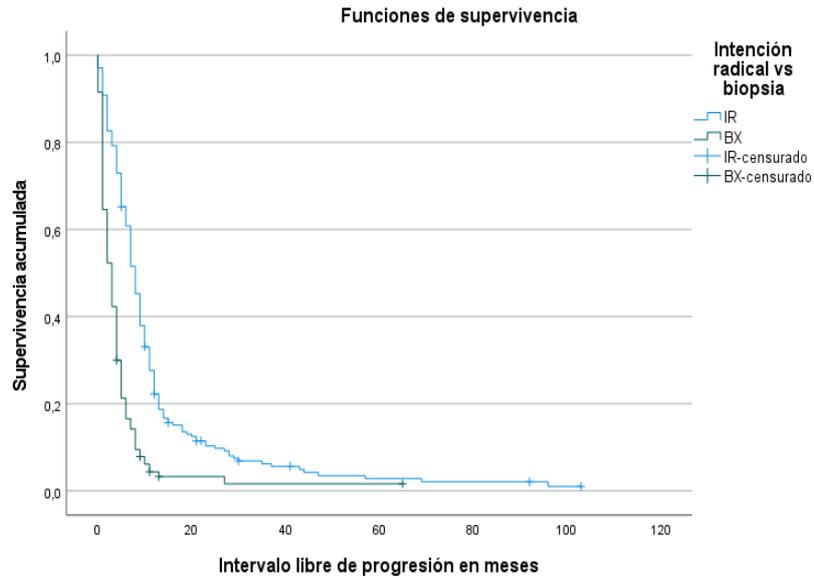


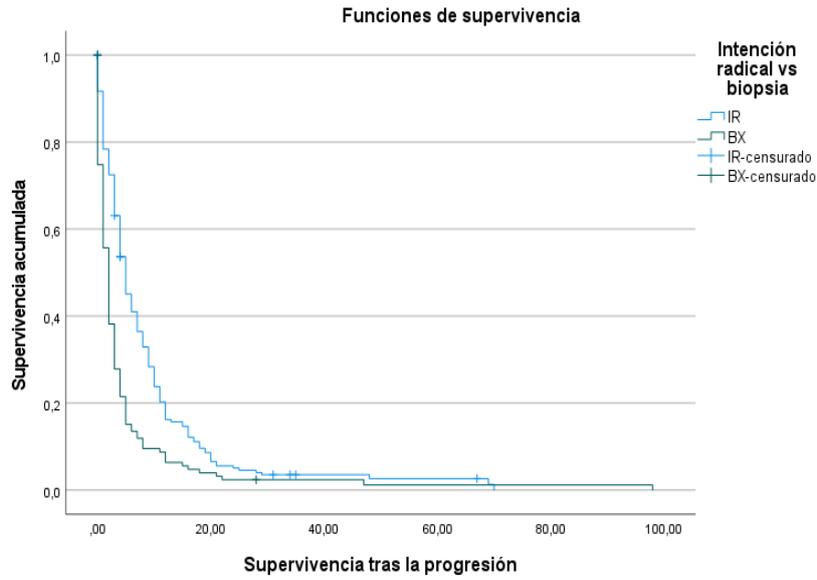
Figura 2. Funciones de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier para la supervivencia global entre resecciones y biopsias en los gliomas de grado IV (n=350) (p<0.001) Resecciones (azul); Biopsias (verde).

- PFS: La mediana del intervalo libre de progresión en los gliomas grado IV de la OMS fue de 5 meses. En función del procedimiento, podemos observar que la mediana del PFS también es mayor en el grupo de intervenidos. [Resecciones: 8 meses, IC95% (7.1-8.8)]; [Biopsias: 3 meses, IC95% (2.2-3.7)]. Al aplicar la prueba log-rank se obtiene una diferencia estadísticamente significativa (p<0.001).



*Figura 3. Funciones de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier para el intervalo libre de progresión entre resecciones y biopsias (n=350) (p<0.001)
Resecciones (azul); Biopsias (verde).*

- PPS: La mediana del intervalo de supervivencia en meses tras la progresión se estimó de forma global en 3 meses (IC95% 2.4-3.6). De nuevo, los pacientes sometidos a cirugías resectivas presentaron mayor supervivencia tras la progresión que sus homólogos sometidos a biopsias diagnósticas [Resecciones: 5 meses, (IC95% 4.0-5.9)]; [Biopsias: 2 meses, (IC95% 1.5-2.4)], con diferencias estadísticamente significativas (test log-rank, p<0.001).



*Figura 4. Funciones de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier para la supervivencia tras la progresión entre resecciones y biopsias (n=350) ($p < 0.001$)
 Resecciones (azul); Biopsias (verde).*

Así, puede observarse como pertenecer al grupo de “resecciones” implica mayor supervivencia global y post- progresión, así como un mayor intervalo libre de progresión en comparación con el grupo de biopsias, con diferencias muy significativas ($p < 0.001$).

4.4. Análisis estadístico del impacto pronóstico de la reintervención en gliomas grado IV de la OMS

Con el fin de investigar el papel de segundos procedimientos en términos pronósticos, y puesto que ninguno de los pacientes biopsiados en el momento del diagnóstico fue tratado mediante resección quirúrgica en la progresión, se incluyeron en este análisis sólo aquellos pacientes tratados con cirugía de exéresis en el diagnóstico (n=166).

En función del tratamiento indicado en la progresión, se establecieron los siguientes 3 grupos:

- Reintervención +/- Quimioterapia de 2ª línea (n=84)
- Quimioterapia de 2ª línea (n=33)
- Tratamiento sintomático exclusivo (n=49)

El análisis univariante mostró diferencias estadísticamente significativas para la supervivencia global entre los 3 grupos (test log-rank, $p < 0.001$). La mediana de supervivencia global para los 3 grupos fue de 19, 16 y 8 meses respectivamente. Con el propósito de minimizar los sesgos, el grupo de pacientes que recibieron en la progresión únicamente tratamiento sintomático fue eliminado de un segundo análisis comparativo. De esta manera, se estableció la comparación únicamente entre aquellos pacientes que recibieron tratamiento activo (n=117).

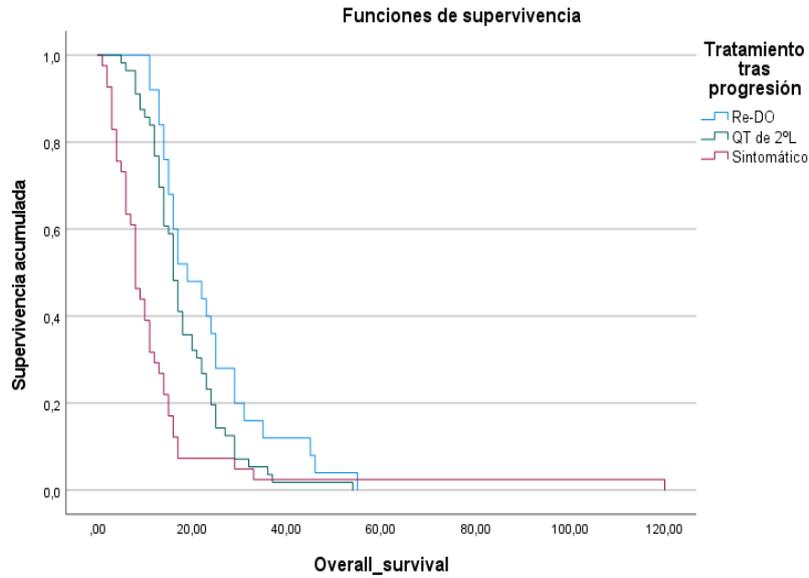


Figura 5. Funciones de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier para la supervivencia global en función del tratamiento recibido en la progresión (n=166) (p<0.001) Reintervención (azul); Quimioterapia (verde); Sintomático (rojo).

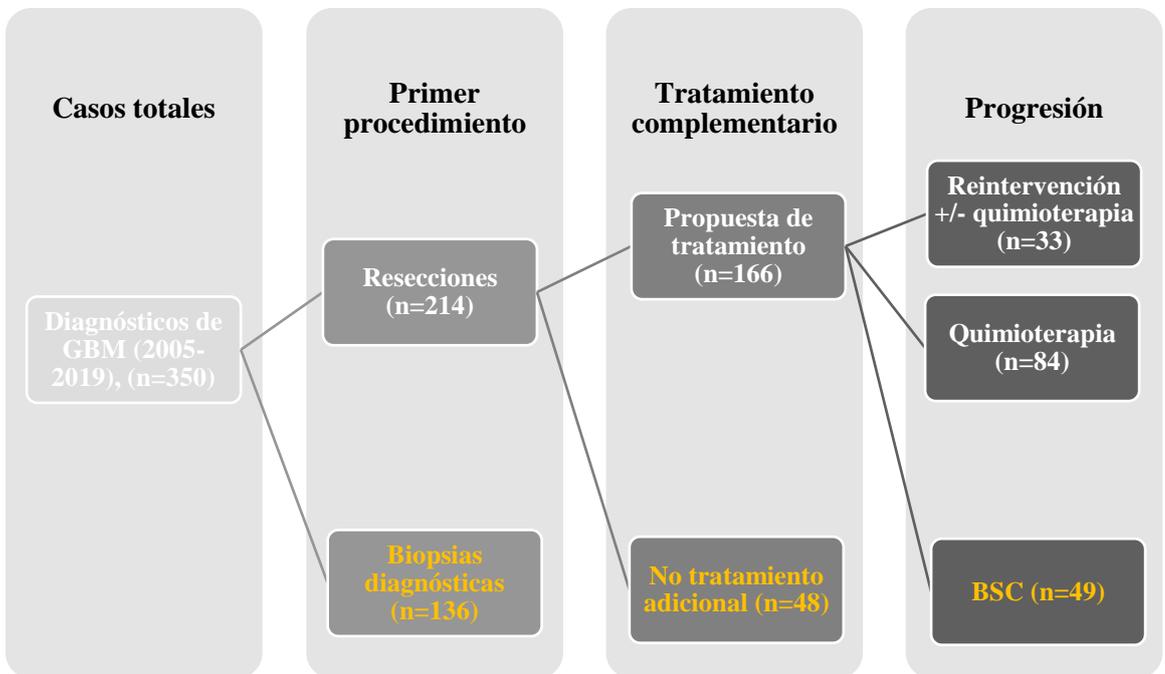


Figura 6. Diagrama de flujo que ejemplifica los criterios de exclusión y los grupos a comparar (n=117).

4.4.1. Comparación entre los grupos de interés

La tabla 15 compara las diferencias entre los dos grupos a estudio, teniendo en cuenta las principales características demográficas y clínicas de los pacientes, las particularidades anatómicas de la lesión y las variables referentes a la primera intervención. Puede observarse que los grupos no presentan diferencias significativas en relación a variables demográficas, anatómicas del tumor o factores relacionadas con el primer procedimiento quirúrgico. La única variable que alcanza significación estadística es el grado de resección quirúrgica ($p=0.036$), siendo más frecuente la resección total en la cohorte de pacientes sometidos a reintervención. Existe una tendencia sin significación estadística hacia una menor edad en el grupo de reintervenidos ($p=0.085$). La mediana de edad en el grupo de pacientes seleccionados para la comparación resultó ser de 58 años. Dicho límite se utilizará para el análisis posterior en las regresiones de Cox. Las variables “complicaciones quirúrgicas” y valoración “ECOG tras la IQ” hacen referencia a la primointervención.

Variable de interés	Re-Do +/- quimioterapia (n=33)	Quimioterapia 2ª línea (n=84)	Test estadístico	p valor
Edad			U-MW	0.085
Media	52.91	57.70		
Mediana	55.00	58.00		
Rango	7-70	31-76		
Sexo			χ^2	0.364
Masculino	17 (51.5%)	51 (60.7%)		
Femenino	16 (48.5%)	33 (39.3%)		
Antecedentes			χ^2	0.351
Significativos	7 (21.2%)	25 (29.8%)		
No signific.	26 (78.8%)	59 (70.2%)		
Clínica			χ^2	0.548
Dismin. NC	0 --	1 (1.2%)		
Motora	6 (18.2%)	11 (13.1%)		
Sensitiva	0 --	2 (2.4%)		
Lenguaje	6 (18.2%)	11 (13.1%)		

Variable de interés	Re-Do +/- quimioterapia (n=33)	Quimioterapia 2ª línea (n=84)	Test estadístico	p valor
Cognitivo	5 (15.2%)	23 (27.4%)		
Crisis	7 (21.2%)	13 (15.5%)		
Cefalea	7 (21.2%)	18 (21.4%)		
Visual	1 (3.0%)	5 (6.0%)		
Sd.general	1 (3.0%)	0 --		
Localización			χ^2	0.415
Central	1 (3.0%)	1 (1.2%)		
Frontal	12 (36.4%)	21 (25.0%)		
Parietal	6 (28.6%)	15 (17.9%)		
Temporal	13 (39.4%)	31 (36.9%)		
Occipital	1 (3.0%)	2 (2.4%)		
Insular	0 --	1 (1.2%)		
Multilobar	0 --	12 (14.3%)		
Fosa Post.	0 --	1 (1.2%)		
Lateralidad			χ^2	0.841
Izquierda	16 (48.5%)	39 (46.4%)		
Derecha	17 (51.5%)	45 (53.6%)		
Volumen (cm³)			U-MW	0.501
Media	30.61	33.52		
Mediana	22.90	24.10		
Rango	1.0-111.9	1.6-116.5		
Resecc. inicial			χ^2	0.036
Total (GTR)	29 (87.9%)	58 (69.0%)		
Subtotal (STR)	4 (12.1%)	26 (31.0%)		
Asistentes			χ^2	0.133
Ninguno	11 (33.3%)	15 (17.9%)		
Navegación	12 (36.4%)	30 (35.7%)		
Avanzado	10 (30.3%)	39 (46.4%)		
Complicaciones			χ^2	0.739
Ninguna	26 (78.8%)	61 (72.6%)		
Grado I	4 (12.1%)	15 (17.9%)		
Grado II	3 (9.1%)	8 (9.5%)		
ECOG tras IQ			χ^2	0.295
Asint. /Leve	30 (90.9%)	70 (83.3%)		
Sintomático	3 (9.1%)	14 (16.7%)		

Tabla 15. Comparación de las variables clínicas y demográficas de los grupos a estudio. Leyenda: Re-Do: reintervención, χ^2 : test chi-cuadrado, U-MW: test U-de Mann-Whitney.

En la siguiente tabla se comparan las variables estudiadas en relación a las características histológicas y factores referentes al diagnóstico molecular del tumor. Puede contemplarse como los grupos no presentan diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas.

Variable de interés	Re-Do +/- quimioterapia (n=33)	Quimioterapia 2ª línea (n=84)	Test estadístico	p valor
Mutación IDH			χ^2	0.922
IDH-wildtype	16 (48.5%)	44 (52.4%)		
IDH-mutado	1 (3.0%)	2 (2.4%)		
No estudiada	16 (48.5%)	38 (45.2%)		
Amplific. EGFR			χ^2	0.660
Amplificado	4 (12.1%)	15 (17.9%)		
No amplificado	9 (27.9%)	18 (21.4%)		
No estudiada	20 (60.6%)	51 (60.7%)		
Metilación MGMT			χ^2	0.433
No metilado	5 (18.2%)	19 (22.6%)		
Metilado	6 (18.2%)	9 (10.7%)		
No estudiado	22 (66.7%)	56 (66.7%)		
Ki67			U-MW	0.251
Media	29.22%	24.50%		
Mediana	25.00%	20.00%		
Rango	2-80%	10-70%		
p53			χ^2	0.847
Positivo	6 (18.2%)	19 (22.6%)		
Negativo	13 (39.4%)	33 (39.3%)		
No estudiado	14 (42.4%)	32 (38.1%)		

Tabla 16. Comparación de las variables anatomopatológicas y moleculares de los grupos a estudio (n=117). Leyenda: Re-Do: reintervención, χ^2 : test chi-cuadrado, U-MW: test U-de Mann-Whitney.

La tabla 17 expone las diferencias entre los grupos estudiados en relación al tratamiento complementario posterior, así como el estado funcional, el tipo y el patrón radiológico en el momento de la progresión. Se observan disparidades con significación estadística entre los grupos afectando a muchas variables. En comparación con la cohorte a la

que se ofreció directamente tratamiento sistémico, el conjunto de pacientes a los que se sometió a una segunda intervención, presenta estas características con mayor frecuencia:

- Compleción del régimen de Stupp (p=0.001).
- Diagnóstico de progresión sin síntomas acompañantes (p=0.020).
- Recidiva con patrón local sin afectar a áreas de alta elocuencia (p<0.001).
- Mejor puntuación en la escala ECOG (p=0.005).

Variable de interés	Re-Do +/- quimioterapia (n=33)	Quimioterapia 2ª línea (n=84)	Test estadístico	p valor
Radioterapia			χ^2	0.529
No radioterapia	0 --	1 (1.2%)		
Radioterapia 60 Gy	33 (100.0%)	83 (98.8%)		
Quimioterapia			χ^2	0.001
No quimioterapia	0 --	1 (1.2%)		
Stupp o más	28 (84.8%)	40 (47.6%)		
Stop	5 (15.2%)	43 (51.2%)		
Pseudoprogresión			χ^2	0.298
Si	12 (36.4%)	39 (47.0%)		
No	21 (63.6%)	44 (53.0%)		
Progresión			χ^2	0.020
Radiológica	20 (60.6%)	31 (36.9%)		
Clínica y Radiol.	13 (39.4%)	53 (63.1%)		
Patrón			χ^2	<0.001
Local, no elocuente	32 (97.0%)	17 (20.2%)		
Elocuente/Invasión	1 (3.0%)	54 (64.3%)		
Diseminada	0 --	13 (15.5%)		
ECOG progresión			χ^2	0.005
Asint. / Leve	27 (81.8%)	45 (53.6%)		
Sintomático	6 (18.2%)	39 (46.4%)		

Tabla 17. Comparación de las variables referentes al tratamiento complementario y al diagnóstico de la progresión de los grupos a estudio (n=117). Leyenda: Re-Do: reintervención, χ^2 : test chi-cuadrado.

La siguiente tabla compara los grupos de interés analizando los datos clínicos que ocurrieron tras la progresión. Se estudian las quimioterapias de segunda línea empleadas, el contexto clínico, el estado funcional del paciente y el patrón radiológico de las segundas progresiones, así como las líneas de antineoplásicos empleadas. Puede observarse que en algunos casos de los grupos a estudio no se realizó prueba de imagen, siendo el diagnóstico de progresión clínico por deterioro neurológico. En 3 casos del grupo de reintervenciones y en uno del grupo tratado con quimioterapia exclusivamente, los sujetos no habían experimentado deterioro clínico y sus resonancias magnéticas de control evidenciaban la enfermedad estable.

Observamos diferencias con significación estadística en gran parte de las variables analizadas. Los pacientes pertenecientes al grupo “Re-Do” fueron tratados de nuevo con temozolamida en más casos, mientras que en los no reintervenidos se indicó con mayor frecuencia bevacizumab, tanto en monoterapia como en combinación, siendo las diferencias encontradas muy significativas ($p < 0.001$). Se detectan asimismo discrepancias entre los grupos con respecto al patrón radiológico de progresión; existiendo un mayor número de segundas progresiones catalogadas como locales sin invasión de áreas de alta elocuencia en el grupo “Re-Do” y una mayor tendencia a patrones de enfermedad diseminada o invasión de áreas elocuentes, ganglios basales o estructuras de línea media en el grupo control ($p = 0.002$). Por otro lado, existe un mayor porcentaje de pacientes asintomáticos o con síntomas leves a la hora del diagnóstico de la segunda progresión en la cohorte de reintervenidos ($p = 0.021$). Por último, existe una tendencia diferencial sin significación estadística en relación al contexto clínico de la segunda progresión ($p = 0.076$).

Variable de interés	Re-Do +/- quimioterapia (n=33)	Quimioterapia 2ª línea (n=84)	Test estadístico	p valor
Quimioterapia 2ªL			χ^2	<0.001
Ninguno	6 (18.2%)	0 --		
TMZ monoterapia	14 (42.4%)	9 (10.7%)		
BVZ monoterapia	4 (12.1%)	39 (46.4%)		
BVZ combinación	4 (12.1%)	32 (38.1%)		
Nitrosureas	5 (15.2%)	4 (4.8%)		
Segunda progresión			χ^2	0.076
Radiológica	5 (15.2%)	10 (11.9%)		
Clínica y Radiol.	19 (57.6%)	54 (64.3%)		
Det. sin imagen	1 (3.0%)	12 (14.3%)		
Det. sin progresión	5 (15.2%)	7 (8.3%)		
No progresión	3 (9.1%)	1 (1.2%)		
Patrón 2ª progresión			χ^2	0.002
Local, no elocuente	11 (33.3%)	6 (7.1%)		
Elocuente/Invasión	9 (27.3%)	41 (48.8%)		
Diseminada	4 (12.1%)	17 (20.2%)		
No diagnóstico	9 (27.3%)	20 (23.8%)		
ECOG 2ª progresión			χ^2	0.021
Asint. / Leve	9 (27.3%)	9 (10.7%)		
Sintomático	21 (63.6%)	74 (88.1%)		
No progresión	3 (9.1%)	1 (1.2%)		

Tabla 18. Comparación de las variables referentes al tratamiento complementario recibido tras la progresión y al diagnóstico de las segundas progresiones de los grupos a estudio (n=117). Leyenda: Re-Do: reintervención, TMZ: temozolamida, BVZ: bevacizumab, Det.: deterioro, χ^2 : test chi-cuadrado

4.4.2. Análisis comparativo de supervivencia entre los grupos

- **OS:** La mediana de supervivencia global del subgrupo a estudio es de 18 meses (IC95% 14.8-21.1). Si estratificamos los pacientes según el tratamiento propuesto, se advierte que la supervivencia global expresada en meses es mayor en el grupo de reintervenidos que en el de tratamiento sistémico [**Re-Do: 25 meses**, IC95% (19.3-30.6)]; [**Quimioterapia 2ª línea: 17 meses**, IC95% 15.2-18.7)], alcanzando

significación estadística (test log-rank, p=0.004). A continuación, se muestra el gráfico con las curvas de supervivencia de los dos grupos comparados.

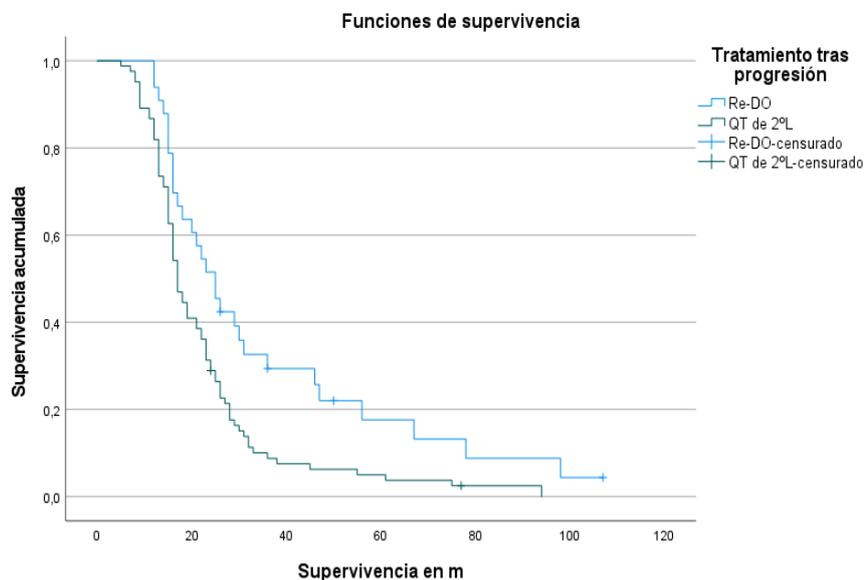


Figura 7. Funciones de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier para la supervivencia global en función del tratamiento recibido en la progresión (n=117) (p=0.004) Reintervención (azul); Quimioterapia (verde).

- PFS: La mediana del intervalo libre de progresión en los pacientes seleccionados fue de 10 meses (IC95% 8.9-11.0). Al desglosar a la población por el tipo de tratamiento indicado podemos observar que la mediana del PFS es mayor en el grupo de pacientes reintervenidos [Re-Do: 12 meses, IC95% (10.1-13.8)]; [Quimioterapia 2ª línea: 9 meses, IC95% (7.8-10.1)]. Al aplicar la prueba de comparaciones globales se obtiene una diferencia estadísticamente significativa (test log-rank, p=0.002). La representación gráfica de las curvas de Kaplan-Meier puede observarse en la figura 8.

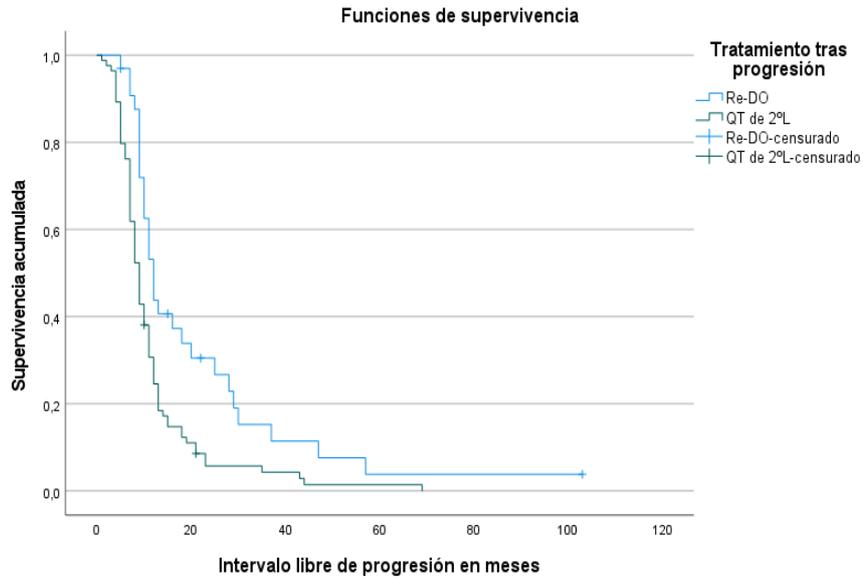


Figura 8. Funciones de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier para el intervalo libre de progresión en función del tratamiento recibido en la progresión ($n=117$) ($p=0.002$) Reintervención (azul); Quimioterapia (verde).

- PPS: La mediana del intervalo de supervivencia en meses tras la progresión se estimó de forma global en 9 meses (IC95% 2.4-3.6). En este caso, no se encontraron diferencias entre los pacientes sometidos a cirugías de rescate y los tratados directamente con tratamiento sistémico. [Re-Do: 9 meses, (IC95% 7.4-10.5)]; [Quimioterapia 2ª línea: 8 meses, (IC95% 5.5-10.4)]. El test log-rank no resultó significativo $p=0.143$.

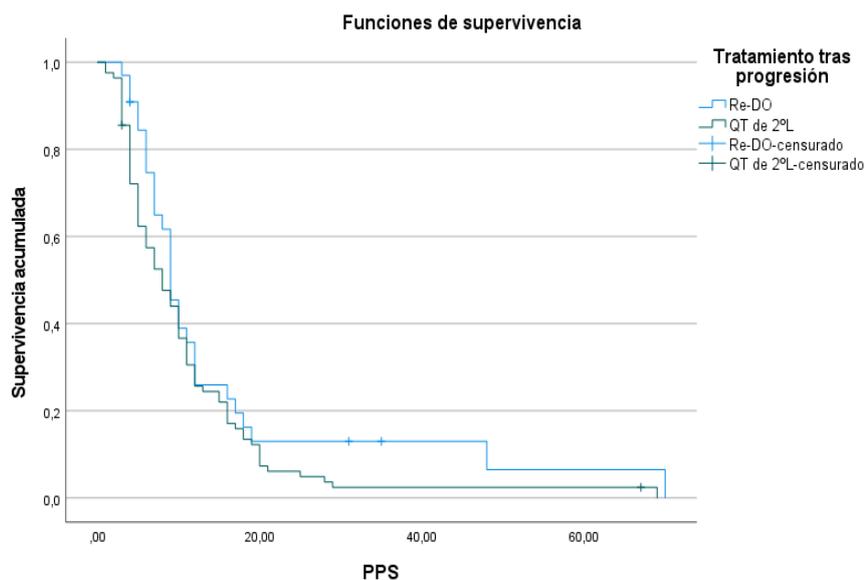


Figura 9. Funciones de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier para la supervivencia post-progresión en función del tratamiento recibido en la progresión (n=117) (p=0.147) Reintervención (azul); Quimioterapia (verde).

Variable de interés	Re-Do +/- quimioterapia (n=33)	Quimioterapia 2ª línea (n=84)	Test estadístico	p valor
OS (meses)			Log-rank	0.004
Media	32.67	22.06		
Mediana	25.00	17.00		
Rango	12-107	5-94		
PFS (meses)			Log-rank	0.002
Media	19.27	11.29		
Mediana	12.00	9.00		
Rango	5-103	1-69		
PPS (meses)			Log-rank	0.143
Media	13.39	10.72		
Mediana	9.00	8.00		
Rango	3-70	1-69		

Tabla 19. Comparación de las variables de supervivencia (endopoints) de los grupos a estudio (n=117). Leyenda: Re-Do: reintervención, OS: supervivencia global, PFS: intervalo libre de progresión, PPS: supervivencia post-progresión. No se detectan diferencias entre grupos en este último parámetro.

4.4.3. *Modelo clásico de regresión de Cox univariante sobre la supervivencia global (OS) para la búsqueda de variables significativas*

A continuación, analizaremos las variables de interés mediante regresión de Cox de forma independiente con el objetivo de identificar variables con impacto pronóstico significativo en la población a estudio (n=117). Se contabilizan 111 eventos (fallecimientos) a fecha 31.12.2021. Las variables cuantitativas se dicotomizaron en función de si superaban o no el valor de la mediana de la población a estudio. Las categorías de referencia (riesgo relativo de 1) se establecieron en concordancia con las que clásicamente se han asociado a peor pronóstico (edad avanzada, resección subtotal, complicaciones severas...) de tal manera que la HR representa la proporción de riesgo de las otras categorías a estudio con sus intervalos de confianza al 95%.

La tabla que observamos a continuación evalúa las variables relacionadas con los aspectos demográficos de los pacientes y con los factores de la primera intervención. Se realizó un análisis adicional agrupando los casos, según fuesen operados en los primeros años de la serie (2005-2011) frente a los más recientes (2012-2019). La tabla refleja que no existe ninguna variable que de forma independiente tenga un impacto pronóstico sobre la supervivencia global (OS) con significancia estadística. Las variables más influyentes en la OS son las puntuaciones de 0 y 1 en la escala ECOG tras la primera intervención (p=0.096), la resección total (p=0.179), los tumores que presentan un volumen en cm³ menor que la mediana de la serie (p=0.270), y, por último, los pacientes con una edad inferior a la mediana (p=0.351). No se detecta que la comorbilidad, el sexo, las herramientas utilizadas por el

cirujano o las complicaciones postoperatorias supongan factores pronósticos al evaluar los HR sobre la OS.

Variable de interés	N.º Eventos / N.º Pacientes (n=117)	HR (IC95%)	p valor
Edad (años)			0.351
Menor mediana (<58)	53/56	0.83 (0.57-1.03)	
Mayor/igual mediana (≥58)	58/61	1	
Sexo			0.549
Masculino	66/68	1.12 (0.76-1.64)	
Femenino	45/49	1	
Antecedentes			0.595
No significativos	80/85	0.89 (0.58-1.35)	
Significativos	31/32	1	
Volumen (cm³)			0.270
Menor mediana (<24)	56/58	0.80 (0.55-1.18)	
Mayor/igual mediana (≥24)	55/59	1	
Asistentes quirúrgicos			0.961
Avanzado	44/49	0.93 (0.57-1.52)	0.782
Navegación	41/42	0.94 (0.57-1.55)	0.961
Ninguno	26/26	1	
Complicaciones			0.653
Ninguna	82/87	0.40 (0.64-1.21)	0.439
Grado I	19/19	0.87 (0.45-1.69)	0.699
Grado II	10/11	1	
Resección inicial			0.179
Total	83/87	0.74 (0.47-1.14)	
Subtotal	28/30	1	
ECOG 1			0.096
Asint./ Leve	94/100	0.64 (0.38-1.08)	
Sintomático	17/17	1	
Fecha intervención			0.148
Reciente (2012-2019)	77/83	0.74 (0.49-1.11)	
Antiguo (2005-2011)	34/34	1	

Tabla 20. Regresión de Cox univariante sobre la supervivencia global para búsqueda de variables significativas en relación con los aspectos demográficos y los factores relacionados con la primera intervención (n=117). Leyenda: HR: razón de riesgos (Hazard Ratio), IC95%: intervalo de confianza al 95%, ECOG 1: ECOG tras la primera intervención.

A continuación, investigamos las variables referentes a la anatomía patológica y al diagnóstico molecular. Debe considerarse que no se dispone de esta información en todos los casos, y por ello, el número de pacientes que se exponen varía en función de dicha disponibilidad. En el estudio de Ki67 como variable pronóstica, los pacientes se dicotomizaron en función de si presentaban un valor o mayor o menor a la mediana de la serie (25%).

La única variable que alcanza significación pronóstica es la metilación del promotor del gen MGMT superior al 9% determinada por pirosecuenciación ($p < 0.001$). En el resto de variables, se observa una tendencia hacia un menor riesgo proporcional en los factores clásicamente considerados protectores (mutación *IDH*, *EGFR* no amplificado, Ki67 menor y p53 negativo). Con respecto a la mutación *IDH*, debe tenerse en consideración que se trata de una serie de pacientes afectos de gliomas grado IV de nueva aparición, en la que las lesiones *IDH-wildtype* suponen la gran mayoría.

Variable de interés	N.º Eventos / N.º Pacientes	HR (IC95%)	p valor
Mutación <i>IDH</i>			0.314
IDH-mutado	3/3	0.54 (0.16-1.77)	
IDH-wildtype	54/60	1	
Amplific. <i>EGFR</i>			0.158
No amplificado	24/27	0.62 (0.33-1.19)	
Amplificado	18/19	1	
Metilación <i>MGMT</i>			<0.001
Metilado	10/15	0.17 (0.06-0.46)	
No metilado	23/24	1	
Ki67			0.271
Menor mediana (<25%)	43/46	0.76 (0.69-1.23)	
Mayor/igual mediana ($\geq 25\%$)	30/33	1	
p53			0.449
Negativo	42/46	0.81 (0.48-1.38)	
Positivo	23/25	1	

Tabla 21. Regresión de Cox univariante sobre la supervivencia global para búsqueda de variables significativas en relación con los aspectos anatomopatológicos y de biología molecular (n=117). Leyenda: HR: razón de riesgos (Hazard ratio), IC95%: intervalo de confianza al 95%

La tabla 22 merece una consideración especial. En ella, se resumen las principales variables analizadas tras la primointervención hasta la progresión. De nuevo, consideramos las variables de referencia como aquellas asociadas a peor pronóstico. No se evaluó la radioterapia en el análisis de riesgos proporcionales ya que casi la totalidad de los pacientes (116/117) recibieron la dosis de 60 Gy. De igual manera, 116/117 casos fueron tratados con temozolamida tras la intervención, por lo que suprimió del análisis la categoría “No quimioterapia”, comparando de esa manera los pacientes con Stupp completo (6 o más ciclos) frente a incompleto (< de 6 ciclos). Con respecto al intervalo libre de progresión (PFS), los pacientes se agruparon en función de si era menor o mayor al valor de la mediana del conjunto de los pacientes seleccionados (10 meses). El análisis univariante con respecto a la supervivencia global muestra que las siguientes variables suponen factores de protección con significación estadística:

- Compleción de los 6 ciclos de temozolamida adyuvante ($p < 0.001$).
- Puntuación de 0 o 1 en la escala funcional de la ECOG en el momento de la progresión ($p = 0.002$).
- Intervalo libre de progresión mayor que la mediana de la serie (10 meses) ($p < 0.001$).
- Pertenencia al grupo de reintervención ($p = 0.006$).

Existe una tendencia para considerar factores de protección (sin alcanzar significación estadística) el patrón de progresión catalogado como local, no elocuente ($p = 0.058$) y la progresión detectada únicamente por neuroimagen ($p = 0.125$).

Variable de interés	N.º Eventos / N.º Pacientes (n=117)	HR (IC95%)	p valor
Quimioterapia			<0.001
Stupp completo	63/68	0.48 (0.32-0.71)	
Stupp incompleto (No quimioterapia)	47/48 1/1	1	
Progresión			0.125
Radiológica	48/51	0.74 (0.50-1.08)	
Clínica y Radiol.	63/66	1	
Patrón			0.058
Local, no elocuente	45/49	0.56 (0.29-1.07)	0.084
Elocuente/Invasión	54/55	0.89 (0.47-1.67)	0.719
Diseminada	12/13	1	
ECOG progresión			0.002
Asint. / Leve	67/72	0.54 (0.37-0.80)	
Sintomático	44/45	1	
PFS (meses)			<0.001
Mayor/igual mediana (≥ 10)	54/59	0.39 (0.26-0.58)	
Menor mediana (< 10)	57/58	1	
Tratamiento progresión			0.006
Re-Do +/- quimioterapia	29/33	0.54 (0.34-0.83)	
Quimioterapia 2ª línea	82/84	1	

Tabla 22. Regresión de Cox univariante sobre la supervivencia global para búsqueda de variables significativas en relación con los aspectos del tratamiento complementario, de la progresión y de su tratamiento (n=117). Leyenda: HR: razón de riesgos (Hazard Ratio), IC95%: intervalo de confianza al 95%, PFS. Intervalo libre de progresión.

4.4.4. Modelo clásico de regresión de Cox multivariante sobre la supervivencia global (OS) con ajuste de covariables

A continuación, se compone una tabla que incluye los resultados de la aplicación de una regresión de Cox multivariante, ajustando posibles variables de confusión identificadas como relevantes en el análisis univariante. El estado de metilación del promotor del gen *MGMT*, pese a tener un valor pronóstico muy significativo, no fue incluido en el modelo por carecer de dicha determinación en 78 casos. Se muestra, pues, un modelo que incluye los dos

grupos de tratamiento, ajustando como covariables las valoraciones según la escala ECOG tras la intervención y en el diagnóstico de la progresión, los ciclos de quimioterapia recibida, y el intervalo libre de progresión dicotomizado en base a la mediana ($<$ o \geq 10 meses). Tras aplicar el modelo, observamos que es significativo ($p < 0.001$). La única variable que conserva la significación estadística es el intervalo libre de progresión dicotomizado según la mediana ($p = 0.004$). El estado funcional en el momento de la progresión parece ser un factor relevante sobre la supervivencia global, sin ser estadísticamente significativo según el modelo ($p = 0.061$). Observamos como el tipo de tratamiento en la progresión, el número de ciclos de temozolamida adyuvante y el estado funcional tras el primer procedimiento han perdido su significación estadística en el modelo multivariante ($p = 0.248$, $p = 0.709$ y $p = 0.261$ respectivamente). El valor del HR para el grupo “reintervención” frente al grupo de quimioterapia utilizado como referencia, controlando el efecto de las covariables consideradas es de 0.75 (IC95% 0.46-1.21), por lo que se concluye que no hay diferencias significativas entre los dos grupos con respecto a la supervivencia global.

Variable de interés	N.º Eventos / N.º Pacientes (n=117)	HR (IC95%)	p valor
Tratamiento progresión			0.248
Re-Do +/- quimioterapia	29/33	0.75 (0.46-1.21)	
Quimioterapia 2ª línea	82/84	1	
Quimioterapia			0.709
Stupp completo	63/68	0.88 (0.46-1.68)	
Stupp incompleto	47/49	1	
ECOG 1			0.261
Asint. /Leve	94/100	0.72 (0.41-1.26)	
Sintomático	17/17	1	
ECOG 2			0.061
Asint. /Leve	67/72	0.67 (0.44-1.01)	
Sintomático	44/45	1	
PFS (meses)			0.004
Mayor/igual mediana (≥ 10)	54/59	0.38 (0.20-0.74)	
Menor mediana (< 10)	57/58	1	

Tabla 23 (página anterior). Regresión de Cox multivariante sobre la supervivencia global para ajuste de variables subrogadas (n=117). Leyenda: Re-Do: reintervención, HR: razón de riesgos (Hazard Ratio), IC95%: intervalo de confianza al 95%, PFS: Intervalo libre de progresión, ECOG 1: ECOG tras la primera intervención, ECOG 2: ECOG en el momento de la progresión.

Si aplicamos métodos de regresión logística “hacia atrás”, obtenemos que el intervalo libre de progresión es la variable más influyente sobre la supervivencia global (p<0.001).

		Variables en la ecuación					95,0% CI para Exp(B)		
		B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Inferior	Superior
Paso 1	Tratamiento tras progresión	-,282	,244	1,332	1	,248	,754	,468	1,217
	Quimioterapia adyuvante	-,122	,329	,139	1	,709	,885	,465	1,685
	ECOG tras IQ COD	-,319	,284	1,261	1	,261	,727	,416	1,269
	ECOG progresion COD	-,399	,213	3,520	1	,061	,671	,443	1,018
	PFS dicotomizada	-,945	,330	8,196	1	,004	,389	,204	,742
Paso 2	Tratamiento tras progresión	-,263	,240	1,208	1	,272	,768	,480	1,229
	ECOG tras IQ COD	-,310	,283	1,200	1	,273	,733	,421	1,277
	ECOG progresion COD	-,406	,212	3,682	1	,055	,666	,440	1,009
	PFS dicotomizada	-,849	,211	16,204	1	<,001	,428	,283	,647
Paso 3	Tratamiento tras progresión	-,299	,237	1,597	1	,206	,741	,466	1,179
	ECOG progresion COD	-,463	,204	5,170	1	,023	,629	,422	,938
	PFS dicotomizada	-,819	,208	15,458	1	<,001	,441	,293	,663
Paso 4	ECOG progresion COD	-,515	,200	6,599	1	,010	,598	,404	,885
	PFS dicotomizada	-,890	,203	19,313	1	<,001	,411	,276	,611

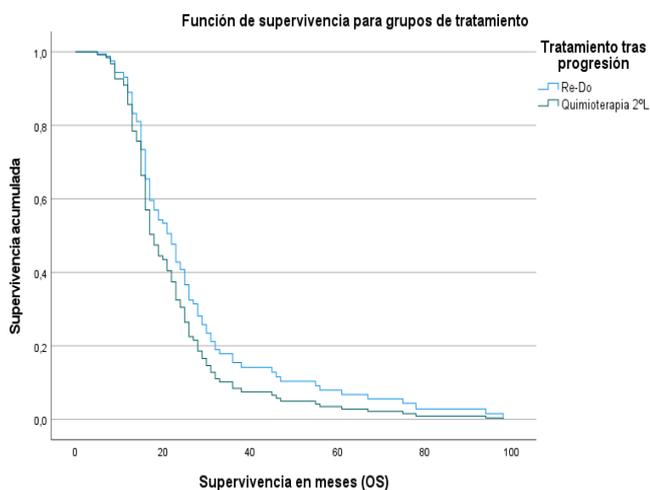


Figura 10: Imagen superior: Captura de pantalla en la que se demuestra la regresión de Cox multivariante en modo “backwards” (hacia atrás), en la que, el intervalo libre de progresión supone la variable con mayor influencia sobre la supervivencia global. Imagen inferior: Gráfica de funciones de supervivencia de los dos grupos comparados ajustada por el modelo multivariante de Cox.

4.4.5. *Modelo clásico de regresión de Cox univariante sobre la supervivencia tras la progresión (PPS) para la búsqueda de variables significativas*

Realizamos de forma homóloga un modelo de análisis univariante mediante regresión de Cox para la búsqueda de variables significativas sobre la supervivencia post-progresión (PPS). Se omiten las variables que no demostraron significación estadística en el modelo univariante sobre la supervivencia global y se modelan otras, como el tipo de quimioterapia utilizada en la 2ª línea. Se incluyen también dos variables que no fueron relevantes en el modelo de Cox univariante sobre la supervivencia global (edad y grado de resección), debido a que han sido demostrados como factores pronósticos independientes en numerosas series. El modelo de riesgos proporcionales con respecto a la PPS pone de manifiesto que los factores que más influyen en ésta son el buen estado clínico en el momento de la progresión ($p=0.002$), el grado de metilación del promotor *MGMT* ($p=0.004$), utilizar algún tipo de quimioterapia de 2ª línea ($p=0.077$) y haber sido tratado en los últimos años de la serie ($p=0.021$). Cabe destacar que poseer un intervalo libre de progresión mayor de 10 meses deja de tener impacto pronóstico sobre la PPS ($p=0.836$).

Variable de interés	N.º Eventos / N.º Pacientes (n=117)	HR (IC95%)	p valor
Edad (años)			0.235
Menor mediana (<58)	53/56	0.89 (0.73-1.07)	
Mayor/igual mediana (≥58)	58/61	1	
Fecha intervención			0.021
Reciente (2012-2019)	77/83	0.61 (0.40-0.92)	
Antiguo (2005-2011)	34/34	1	
Resección qx.			0.492
Total (GTR)	83/87	0.85 (0.55-1.32)	
Subtotal (STR)	28/30	1	
Tratamiento progresión			0.166
Re-Do +/- quimioterapia	29/33	0.73 (0.47-1.13)	
Quimioterapia 2ª línea	82/84	1	
Quimioterapia			0.791
Stupp completo	63/68	0.95 (0.64-1.38)	
Stupp incompleto	47/49	1	
ECOG 1			0.219
Asint. /Leve	94/100	0.71 (0.42-1.21)	
Sintomático	17/17	1	
ECOG 2			0.002
Asint. /Leve	67/72	0.52 (0.35-0.78)	
Sintomático	44/45	1	
PFS (meses)			0.836
Mayor/igual mediana (≥10)	54/59	0.96 (0.65-1.40)	
Menor mediana (<10)	57/58	1	
Quimioterapia de 2ª línea			0.077
TMZ monoterapia	20/23	0.29 (0.11-0.74)	0.010
BVZ monoterapia	42/43	0.44 (0.18-1.06)	0.070
BVZ combinación	34/36	0.32 (0.13-0.81)	0.016
Nitrosureas	9/9	0.58 (0.20-1.66)	0.318
Ninguno	6/6	1	
Metilación MGMT			0.004
Metilado (≥9%)	10/15	0.28 (0.12-0.66)	
No metilado (<9%)	23/24	1	

Tabla 24. Regresión de Cox univariante sobre la supervivencia post-progresión para búsqueda de variables significativas (n=117). Leyenda: HR: razón de riesgos (Hazard Ratio), IC95%: intervalo de confianza al 95%, ECOG 1: ECOG tras la primera intervención, ECOG 2: ECOG en el momento de la progresión PFS: Intervalo libre de progresión, TMZ: temozolamida, BVZ: bevacizumab

4.4.6. *Modelo clásico de regresión de Cox multivariante sobre la supervivencia tras la progresión (PPS) con ajuste de covariables*

Del mismo modo, se compone una tabla que incluye los resultados de la aplicación de un modelo de Cox multivariante, ajustando posibles variables de confusión, de igual manera que se efectuó con la supervivencia global. De nuevo, el estado de metilación del gen *MGMT*, no fue incluido en el modelo por carecer de dicha información en 78 casos. La regresión incluye los dos tipos de tratamiento a comparar, ajustando como covariables el estado clínico en la progresión, el año en el que se realiza el diagnóstico y el intervalo libre de progresión, ambos categorizados de forma dicotomizada. El modelo multivariante resultó significativo ($p=0.002$). Los factores que de forma independiente conservan la significación estadística tras el ajuste por covariables, siendo pronósticos sobre la PPS son el estado clínico según la escala ECOG en el momento de la progresión ($p=0.006$) y el haber sido tratado a partir del año 2012 ($p=0.018$). El riesgo proporcional en el grupo de pacientes sometidos a reintervención es de 0.76 con un intervalo de confianza al 95% que incluye al 1 y con una p no significativa ($p=0.277$), por lo que el modelo concluye que no hay diferencias entre los tratamientos considerando la supervivencia post-progresión.

Variable de interés	N.º Eventos / N.º Pacientes (n=117)	HR (IC95%)	p valor
Tratamiento progresión			0.277
Re-Do +/- quimioterapia	29/33	0.76 (0.47-1.24)	
Quimioterapia 2ª línea	82/84	1	
Fecha intervención			0.018
Reciente (2012-2019)	77/83	0.59 (0.39-0.91)	
Antiguo (2005-2011)	34/34	1	
ECOG 2			0.006
Asint. /Leve	67/72	0.55 (0.36-0.84)	
Sintomático	44/45	1	
PFS (meses)			0.356
Mayor/igual mediana (≥ 10)	54/59	1.12 (0.80-1.82)	
Menor mediana (< 10)	57/58	1	

Tabla 25. Regresión de Cox multivariante sobre la supervivencia post-progresión para el ajuste de variables subrogadas (n=117). Leyenda: Re-Do: reintervención, HR: razón de riesgos (Hazard Ratio), IC95%: intervalo de confianza al 95%, PFS: Intervalo libre de progresión, ECOG 2: ECOG en el momento de la progresión.

4.4.7. Modelo de regresión de Cox con variables tiempo-dependientes

Se realiza de forma análoga una regresión de Cox considerando a la reintervención como covariable tiempo-dependiente. En este supuesto, el software SPSS dividirá el tiempo de seguimiento de los pacientes reintervenidos en dos intervalos, uno anterior a haber sido reintervenido y otro posterior (desde la reintervención hasta el fallecimiento o el final del periodo de seguimiento). Para realizar este análisis se creó una nueva variable en la matriz de datos denominada “T_COV”, y se adjudicó el valor numérico correspondiente al mes en el que se había realizado la reintervención.

Realizamos este tipo de análisis considerando a la reintervención como variable tiempo-dependiente de forma aislada y también dentro de un escenario multivariante

incluyendo las variables con significación estadística en los modelos de regresión clásicos. Al considerarla como variable única, se obtiene una estimación del riesgo proporcional mayor que 1, [HR 1.44 (IC95% 0.97-2.13)], sin alcanzar significación estadística (p=0.068). El modelo estima que el riesgo es mayor al introducir posibles variables subrogadas [HR 1.76 (IC95% 1.10-2.80)] con significación estadística (p=0.017). Dentro del modelo multivariante, el intervalo libre de progresión mayor a 10 meses [HR 0.43 (IC95% 0.22-0.83); p=0.012] y el buen estado funcional según la escala ECOG en el momento de la progresión [HR 0.57 (IC95% 0.37-0.88); p=0.011] son las variables más influyentes sobre una mayor supervivencia global.

Variable de interés	N.º Eventos / N.º Pacientes (n=117)	HR (IC95%)	p valor
Reintervención como variable tiempo-dependiente			0.017
Reintervención	29/33	1.76 (1.10-2.80)	
No reintervención	82/84	1	
Quimioterapia			0.687
Stupp completo	63/68	0.87 (0.46-1.65)	
Stupp incompleto	47/49	1	
ECOG tras IQ			0.185
Asint. /Leve	94/100	0.68 (0.39-1.19)	
Sintomático	17/17	1	
ECOG 2			0.011
Asint. /Leve	67/72	0.57 (0.37-0.88)	
Sintomático	44/45	1	
PFS (meses)			0.012
Mayor/igual mediana (≥ 10)	54/59	0.43 (0.22-0.83)	
Menor mediana (< 10)	57/58	1	

Tabla 26. Regresión de Cox multivariante sobre la supervivencia global considerando la reintervención como variable tiempo-dependiente (n=117). Leyenda: HR: razón de riesgos (Hazard Ratio), IC95%: intervalo de confianza al 95%, PFS: Intervalo libre de progresión, ECOG 2: ECOG en el momento de la progresión.

4.5. Estadística descriptiva sobre los gliomas grado III de la OMS

- Síntomas: En el caso de los gliomas catalogados como grado III de la OMS, la epilepsia fue la manifestación clínica que motivó con mayor frecuencia el diagnóstico. En orden descendente, se observan síntomas de tipo cognitivo o conductual, déficit motor y cefalea. La siguiente tabla recoge la totalidad de las variables clínicas que llevaron al diagnóstico de la lesión.

Síntoma	Número de casos	Porcentaje
Crisis epilépticas	31	40.3%
Cognitivo/conductual	16	20.8%
Déficit motor	11	14.3%
Cefalea/vómitos	9	11.7%
Alteración del lenguaje	3	3.9%
Alteración sensitiva	3	3.9%
Clínica cerebelosa	2	2.6%
Disminución nivel conciencia	1	1.3%
Alteración visual	1	1.3%
TOTAL	77	100%

Tabla 27. Manifestaciones clínicas en los pacientes con tumores grado III de la OMS (n=77)

- Localización: A diferencia de los gliomas grado IV, que con mayor frecuencia se sitúan sobre el lóbulo temporal, en las lesiones de grado III, la localización más recurrente es el lóbulo frontal (20 casos, 26.0%), seguida por la afectación de más de un lóbulo (19 casos, 24.7%). Es también más frecuente la aparición alrededor del surco central (6 casos, 7.8%), lo que supondría un aumento porcentual de las lesiones

anatómicamente frontales. Con respecto a la lateralidad y en contraste con las lesiones de mayor grado histológico, son más frecuentes en el lado izquierdo (33 casos, 42.9%) y más propensas a invadir estructuras de la línea media (8 casos, 10.4%).

Localización	Número de casos	Porcentaje
Frontal	20	26.0%
Multilobar	19	24.7%
Temporal	9	11.7%
Afectación línea media	8	10.4%
Central	6	7.8%
Afect GGBB/cáspula/tálamo	6	7.8%
Tronco / fosa posterior	4	5.2%
Parietal	1	1.3%
Occipital	1	1.3%
Selar / paraselar	1	1.3%
Insular	1	1.3%
Intraventricular	1	1.3%
TOTAL	77	100%

Tabla 28. Localización anatómica de las lesiones de grado III de la OMS (n=77).

-Tipo de tratamiento quirúrgico: Se indicó un mayor número de biopsias (43 casos, 55.8%) que de resecciones lesionales (34 casos, 44.2%) en los gliomas grado III. Con respecto a las biopsias, se realizaron más procedimientos a cielo abierto (32 casos, 74.4%) que intervenciones con técnicas estereotácticas (11 casos, 25.6%). La indicación de biopsia se debió de nuevo a factores relacionados con la anatomía lesional: enfermedad multilobar o multicéntrica (21 casos, 48.8%), afectación de áreas elocuentes (13 casos, 30.2%), afectación de ganglios basales, cápsula interna, tálamo o tronco encefálico (8 casos, 18.6%). En sólo un caso (2.3%) se indicó por comorbilidad o edad elevada del paciente.

-Volumen lesional: El volumen de la lesión se determinó mediante el método $\frac{a \cdot b \cdot c}{2}$ en todas las resecciones salvo en un caso (97.1%). La mediana obtenida fue de 40.5 cm³ (1.0-158.9 cm³), mayor que en los gliomas grado IV de la OMS (24.2 cm³). Se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov concluyéndose que deberán utilizarse pruebas paramétricas para analizar esta variable (test K-S; p=0.100).

-Datos histopatológicos: En cuanto a las variables referentes a los estudios inmunohistoquímicos y de biología molecular, se obtuvieron las siguientes informaciones:

- p53: Estudiada en 49 de 77 casos (63.6%). A diferencia de los gliomas de grado IV, se obtuvo un resultado positivo en más muestras (27 casos, 55.1%). Los estudios negativos o con tinción inmunohistoquímica débil fueron menos frecuentes (22 casos, 44.9%).
- Ki67: Estudiada en 63 muestras (81.8%). La mediana obtenida fue del 20% (5-50%), ligeramente menor a la obtenida en los gliomas de grado IV (25%). Al aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov se concluye que la distribución no es normal (p<0.001).
- Mutación IDH-1: Disponible en 36/77 muestras (46.7%). Se observa un mayor porcentaje de tumores que presentan mutación

IDH-1 (12 casos, 33.3%), aunque los tumores IDH-*wildtype* siguen siendo los más prevalentes (24 casos, 66.7%).

- Grado de metilación del promotor MGMT: Su determinación está disponible únicamente en 10/77 casos (13.0%). A diferencia de los gliomas grado IV, encontramos más muestras que exhiben un promedio de metilación superior al 9% (6 casos, 60%).
- Amplificación EGFR: Definida en 20/77 pacientes (26.0%). De forma similar a los tumores de mayor grado histológico, son más prevalentes aquellos que no presentan amplificación del gen, y lo hacen con mucha menor frecuencia (18 casos, 90.0%).
- Codelección 1p/19q: Estudiada en los tumores con componente oligodendrogial. Se obtuvo la información en 16/21 muestras, siendo más frecuente la ausencia de codelección (10 casos, 62.5%). Con respecto a la antigua nomenclatura, casi todas las codelecciones se obtuvieron en tumores catalogados como oligodendroglioma anaplásico. En sólo un caso de oligoastrocitoma anaplásico se evidenció la positividad.

-Grado de resección postoperatoria: Evaluada en 33/34 cirugías resectivas (97.1%).

Se evidenció la resección total (GTR) en 24/34 casos (70.6%), resección parcial

máxima en 7 casos (20.6%) y resección parcial en 2 casos (5.9%). En sólo un caso (2.9%) no se evaluó.

-Asistentes quirúrgicos: La herramienta mayormente utilizada fue el neuronavegador (14 casos, 41.1%). La RM intraoperatoria fue empleada en 10 casos (29.4%), por lo que el cirujano estuvo asistido por la neuronavegación en 24/34 casos (70.5%). El 5-ALA preoperatorio fue administrado únicamente en 5/34 casos (14.7%). En un solo caso (2.9%), se utilizaron técnicas de mapeo intraoperatorio del lenguaje. En los 9 casos restantes (26.5%), no se describió el uso de ningún asistente.

-Complicaciones postoperatorias: Los eventos adversos fueron menos frecuentes en el grupo de pacientes con gliomas grado III. 14 sujetos (18.2%) experimentaron complicaciones grado I según la clasificación de Landriel-Ibáñez, en 3 pacientes (3.9%) se registraron complicaciones catalogadas como grado II, un caso (1.3%) requirió ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos y se documentaron 2 casos (2.6%) de éxitus como consecuencia directa de la intervención. Si analizamos el número de complicaciones por procedimiento (resecciones vs biopsias), aplicando el test χ^2 , se concluye que en nuestra serie no existen diferencias significativas entre los grupos para los diferentes tipos de complicaciones ($p=0.642$)

Complicaciones	Resecciones	Biopsias	TOTAL
Ninguna	24 (70.6%)	33 (76.7%)	57 (74.0%)
Grado I	6 (17.6%)	8 (18.6%)	14 (18.2%)
Grado II	3 (8.8%)	0 --	3 (3.9%)
Grado III	0 --	1 (2.3%)	1 (1.3%)
Grado IV	1 (2.9%)	1 (2.3%)	2 (2.6%)
TOTAL	34 (100%)	43 (100%)	77 (100%)

Tabla 29. Complicaciones postquirúrgicas de los pacientes afectados de gliomas grado III de la OMS (n=77) definidas por la clasificación de Landriel-Ibáñez (Ibáñez et al., 2011).

-Estado funcional tras la intervención: Las valoraciones según la escala ECOG tras la intervención fueron las siguientes: paciente asintomático (ECOG 0; 15 casos, 19.5%), síntomas leves (ECOG 1; 35 casos, 45.5%), síntomas moderados (ECOG 2; 19 casos, 24.7%); síntomas limitantes (ECOG 3; 6 casos, 7.8%); éxitus tras el ingreso (ECOG 5; 2 casos, 2.6%). Realizamos de nuevo una nueva tabla de contingencia en función del tipo de procedimiento. Al igual que sucede con los gliomas de grado IV, los pacientes sometidos a resecciones tienen mejor estado funcional que los biopsiados. Aplicando el test χ^2 , se concluye que en el grupo de pacientes con tumores de grado III existen diferencias significativas entre el estado funcional postoperatorio del enfermo y el tipo de procedimiento ($p < 0.001$).

Valoración funcional	Resecciones	Biopsias	TOTAL
ECOG 0	14 (41.2%)	1 (2.3%)	15 (19.5%)
ECOG 1	17 (50.0%)	18 (41.9%)	35 (45.5%)
ECOG 2	0 --	19 (44.2%)	19 (24.7%)
ECOG 3	2 (5.9%)	4 (9.3%)	6 (7.8%)
ECOG 4	0 --	0 --	0 --
ECOG 5 (éxitus)	1 (2.9%)	1 (2.3%)	2 (2.6%)
TOTAL	34 (100%)	43 (100%)	77 (100%)

Tabla 30. Valoración funcional según la escala ECOG tras la primointervención en pacientes con gliomas grado III de la OMS (n=77) (Oken et al., 1982).

-Radioterapia postoperatoria: 50 pacientes (64.9%) recibieron una dosis de 60 Gy. En 8 casos (10.4%) se completó un régimen de radioterapia con dosis total de 40 Gy. Dos pacientes (2.6%) no finalizaron el régimen de radioterapia y en los 17 casos restantes (22.1%) no se indicó el tratamiento con radioterapia o se realizó en otro centro. En los pacientes biopsiados se indicó más frecuentemente un régimen

holocraneal, hipofraccionado, o no se trataron. El resultado del test χ^2 vuelve a concluir que existen diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.001$).

Radioterapia	Resecciones	Biopsias	TOTAL
60 Gy	31 (91.2%)	19 (44.2%)	50 (64.9%)
Holo. / Hipo. (40Gy)	1 (2.9%)	7 (16.3%)	8 (10.4%)
Stop	0 --	2 (4.7%)	2 (2.6%)
No radioterapia	2 (5.9%)	13 (30.3%)	15 (19.5%)
Otro centro	0 --	2 (4.7%)	2 (2.6%)
TOTAL	34 (100%)	43 (100%)	77 (100%)

Tabla 31. Dosis de radioterapia recibida por los pacientes afectados de gliomas grado III de la OMS (n=77). Holo: radioterapia holocraneal; Hipo: radioterapia hipofraccionada.

-Quimioterapia postoperatoria: La tasa de pacientes que completaron el régimen de Stupp fue mayor en los gliomas de grado III (37 casos, 48.1%) que en los de mayor grado histológico (26.6%). En 21/77 casos (27.3%), el paciente no finalizó la fase de adyuvancia con TMZ. 19 pacientes (24.7%) no recibieron quimioterapia o fueron tratados en otro centro. De nuevo, se observa que finalizar el régimen de Stupp es un hecho más frecuente en pacientes sometidos a una cirugía con intención radical. El test χ^2 indica que existen diferencias significativas ($p < 0.001$).

Quimioterapia	Resecciones	Biopsias	TOTAL
Finaliza Stupp	27 (79.4%)	10 (23.3%)	37 (48.1%)
Stop quimioterapia	4 (11.8%)	17 (39.5%)	21 (27.3%)
No quimioterapia	3 (8.8%)	12 (27.9%)	15 (19.5%)
Otro centro	0 --	4 (9.3%)	4 (5.1%)
TOTAL	34 (100%)	43 (100%)	77 (100%)

Tabla 32. Grado de cumplimiento del esquema Stupp en pacientes con gliomas grado III de la OMS (n=77) (Stupp et al., 2005).

-Progresión de la enfermedad: El fenómeno de pseudoprogresión se planteó en 13/77 casos (16.9%). Se observa que el número de supervivientes al finalizar el periodo de seguimiento es mayor en los pacientes con gliomas de grado III (14 casos, 18.2%) que en los de grado IV (1.1%), sobre todo en los enfermos pertenecientes al grupo de cirugías resectivas. La progresión clínica y radiológica se evidenció en 27 casos (35.1%), mientras que únicamente radiológica en 14 casos (18.2%). En total, se evidenció la progresión de la enfermedad mediante pruebas de neuroimagen en 41/77 pacientes, 53.3%). Al segmentar el grupo en función del procedimiento, se observan diferencias significativas (test χ^2 , $p < 0.001$).

Progresión	Resecciones	Biopsias	TOTAL
Radiológica	9 (26.5%)	5 (11.6%)	14 (18.2%)
Clínica y radiológica	9 (26.5%)	18 (41.9%)	27 (35.1%)
Clínica	4 (11.8%)	14 (32.5%)	15 (30.3%)
Perdido en el seguimiento	1 (2.9%)	3 (7.0%)	4 (5.2%)
Vivo, sin progresión	11 (32.3%)	3 (7.0%)	14 (18.2%)
TOTAL	34 (100%)	43 (100%)	77 (100%)

Tabla 33. Escenarios clínicos en el diagnóstico de progresión de los gliomas grado III de la OMS (n=77).

- Patrón radiológico de progresión: De los 41 casos en los que se evidenció la progresión tumoral a través de las pruebas de imagen, se observó una recidiva local con invasión de zonas elocuentes o estructuras profundas en 22 pacientes (53.7%). Diez pacientes (24.4%) experimentaron una progresión local sin afectar a áreas elocuentes. Los 9 casos restantes (22.0%) se catalogaron como “enfermedad diseminada”. Vuelven a apreciarse diferencias significativas entre los grupos (test χ^2 , $p = 0.003$), ya que las progresiones con patrón local sin afectación elocuente o de

estructuras no reseables son más frecuentes en el grupo de resecciones, mientras que los otros patrones predominan en el grupo de biopsiados.

Patrón progresión	Resecciones	Biopsias	TOTAL
Local, no elocuente	9 (50.0%)	1 (4.3%)	10 (24.4%)
Local elocuente o profunda	7 (38.9%)	15 (65.2%)	22 (53.7%)
Enfermedad diseminada	2 (11.1%)	7 (30.4%)	9 (22.0%)
TOTAL	18 (100%)	23 (100%)	41 (100%)

Tabla 34: Patrón radiológico de la recidiva de la enfermedad en gliomas de grado III de la OMS (n=77).

-Tratamiento de la progresión: El tratamiento más empleado en los 41 pacientes diagnosticados de recidiva o progresión consistió en quimioterapia de 2ª línea (23 casos, 56.1%). En 8 casos (19.5%) se indicó una reintervención y quimioterapia adicional, por lo que la progresión se trató activamente en 31 casos (75.6%). En el resto (10 casos, 24.4%), se optó por BSC. Existen diferencias significativas entre grupos, ya que en ningún paciente biopsiado se indicó una reintervención (test χ^2 , p=0.002). De manera análoga a lo realizado anteriormente, se excluirán los pacientes sin diagnóstico de progresión, las biopsias y los pacientes no tratados activamente.

Tratamiento progresión	Resecciones	Biopsias	TOTAL
Reintervención +/- QMT	8 (44.4%)	0 --	8 (19.5%)
QMT 2ª línea	7 (38.9%)	16 (69.6%)	23 (56.1%)
Sintomático (BSC)	3 (16.7%)	7 (30.4%)	10 (24.4%)
TOTAL	18 (100%)	23 (100%)	41 (100%)

Tabla 35. Tipo de tratamiento en la progresión de la enfermedad de los gliomas grado III (n=77). En amarillo se destacan los grupos a comparar: reintervención frente a tratamiento sistémico en pacientes sometidos a resección inicialmente.

-Reintervenciones: 8 pacientes fueron reintervenidos de gliomas grado III de la OMS. En 2 casos (25.0%) se observó una progresión del grado histológico, ya que la anatomía patológica fue compatible con glioblastoma. En 5 casos (62.5%) el análisis reveló mismo diagnóstico. En el caso restante (12.5%), el resultado fue compatible con radionecrosis. Las complicaciones postoperatorias fueron menos frecuentes en este grupo, y sólo se registraron complicaciones de grado I en 2 casos (25.0%). Con respecto a la resección tumoral, se logró una resección total en 5 casos, (62.5%), parcial máxima en 1 caso (12.5%), y parcial en otro (12.5%). En el caso restante (12.5%) la resección no fue valorable. El estado funcional tras la reintervención reveló que la mayor parte de los enfermos presentaban buenas valoraciones [ECOG 0: 1 caso (12.5%), ECOG 1: 5 casos (62.5%), ECOG 2: 2 casos (25.0%)].

Reintervenciones			
Anat.Patológica	2 Glioblastoma (25.0%)	5 Grado III (62.5%)	1 Radionecrosis (12.5%)
Resección	5 Total (62.5%)	2 Parcial (25.0%)	1 No valorable (12.5%)
Complicaciones	6 Ninguna (75.0%)	2 Grado I (25.0%)	
ECOG	1 ECOG 0 (12.5%)	5 ECOG 1 (62.5%)	2 ECOG 2 (25.0%)

Tabla 36. Estadística descriptiva perteneciente al grupo de reintervenidos de gliomas grado III de la OMS (n=8).

-Segundas líneas de quimioterapia: De los 31 pacientes en los que trató activamente la progresión, todos recibieron quimioterapia adicional como parte de su esquema terapéutico. El bevacizumab vuelve a ser el fármaco más empleado (19 casos, 61.3%), ya sea en monoterapia (10 casos) o en combinación (9 casos). Las

nitrosureas se emplearon siempre en combinación con BVZ (4 casos, 12.9%). La temozolamida se empleó en 10 casos (32.3%), generalmente en monoterapia, aunque acompañada de un nuevo esquema de radioterapia en 2 casos (6.5%). El irinotecan se administró mayoritariamente con BVZ (5 casos, 16.1%) o cisplatino (2 casos, 6.5%).

4.6. *Análisis de supervivencia comparativo entre resecciones y biopsias en gliomas de grado III de la OMS*

A fecha 31.12.2021, se certificó el fallecimiento de 52 pacientes (67.5%). Se censuraron 25 casos (32.5%), ya que 20 continuaban vivos al final del seguimiento (26.0%) y 5 (6.5%) se consideraron perdidos. La mayoría de los pacientes vivos pertenecen al grupo de cirugías resectivas (15 casos).

- OS: El valor global de la mediana de supervivencia en la serie se estima en 17 meses (IC95% 10.5-23.4). Según el procedimiento propuesto, se advierten grandes diferencias en los valores de supervivencia global [Resecciones: 79 meses, IC95% (0-183.3)]; [Biopsias: 9 meses, IC95% 4.0-13.9)] con significancia estadística (test log-rank, p=0.000).
- PPS: La mediana de supervivencia tras la progresión fue de 8 meses (IC95% 4.4-11.5). De nuevo, los pacientes sometidos a resecciones presentaron mayor supervivencia tras la progresión que sus homólogos incluidos en el grupo de

biopsias [Resecciones: 17 meses, (IC95% 6.9-27.0)]; [Biopsias: 7 meses, (IC95% 5.1-8.8)]. El test *log-rank* no alcanza significancia estadística ($p=0.051$).

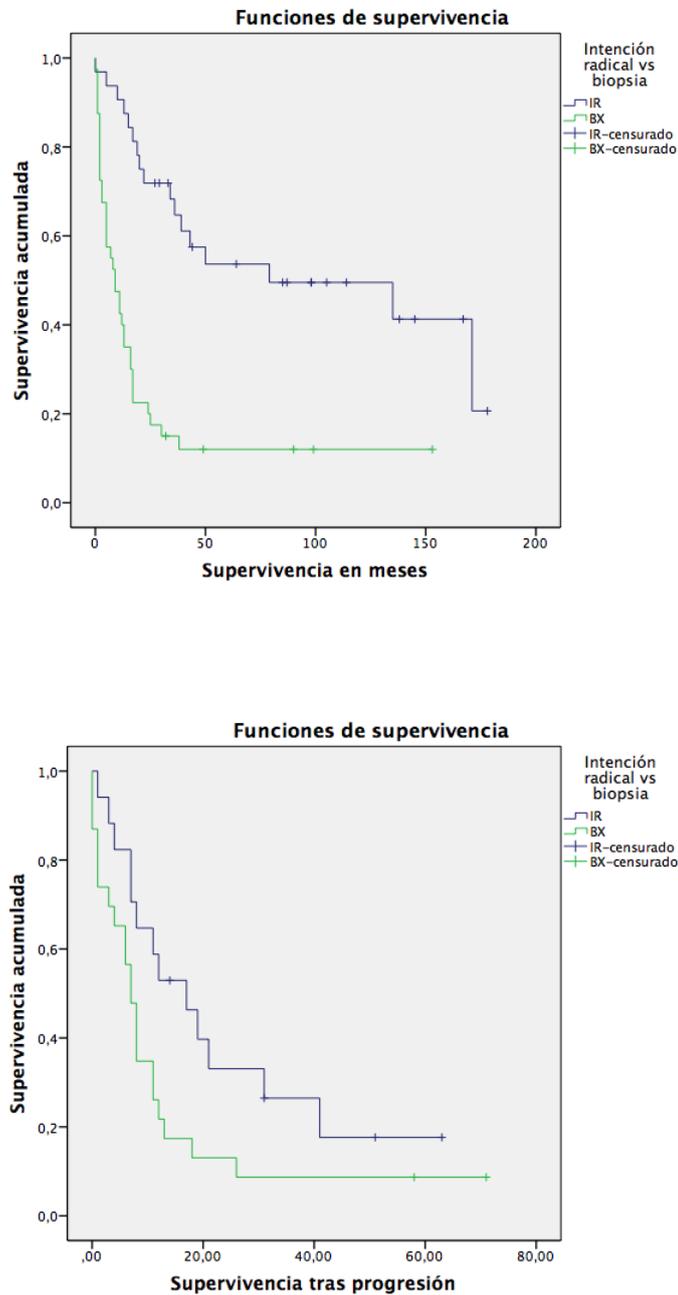


Figura 11. Imagen superior: Funciones de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier para la supervivencia global entre resecciones y biopsias en gliomas grado III ($n=77$) ($p=0.000$). Imagen inferior: Funciones de supervivencia para la supervivencia post-progresión ($p=0.051$). Resecciones (azul); Biopsias (verde).

4.7. Análisis estadístico del impacto pronóstico de la reintervención en gliomas grado III de la OMS

4.7.1. Comparación de los grupos de interés

Debido al escaso número de pacientes (n=15), tras formalizar los criterios de exclusión en los gliomas de grado III, se compone una tabla más reducida teniendo en cuenta las variables clásicas significativas y las que mostraron mayor significación estadística en el análisis de los gliomas de mayor grado histológico. La mediana de edad del conjunto de pacientes fue de 38 años. No se observan diferencias significativas en relación a variables demográficas, dependientes del tumor o de la primera intervención. La única variable que alcanza significación estadística es el patrón radiológico en la progresión de la enfermedad (p=0.009), ya que todas las reintervenciones se indicaron en recidivas locales sin invasión de áreas elocuentes.

Variable de interés	Re-Do +/- quimioterapia (n=8)	Quimioterapia 2ª línea (n=7)	Test estadístico	p valor
Edad			T-S	0.115
Media	35.50	46.57		
Mediana	34.50	48.00		
Rango	18-65	14-71		
Sexo			χ^2	0.438
Masculino	7 (87.5%)	5 (71.4%)		
Femenino	1 (12.5%)	3 (28.6%)		
Antecedentes			χ^2	0.067
Significativos	1 (12.5%)	4 (57.1%)		
No signific.	7 (87.5%)	3 (42.9%)		
Volumen (cm³)			U-MW	0.253
Media	44.13	30.37		
Mediana	45.55	7.3		
Rango	9.8-78.2	1.0-158.9		
Resección qx.			χ^2	0.714
Total (GTR)	5 (62.5%)	5 (71.4%)		
Subtotal (STR)	3 (37.5%)	2 (28.6%)		
Complicaciones			χ^2	0.438
Ninguna	7 (87.5%)	5 (71.4%)		
Leves	1 (12.5%)	2 (28.6%)		
ECOG 1				
Asint. /Leve	8 (100.0%)	7 (100.0%)		
Sintomático	0 --	0 --		
Quimioterapia			χ^2	0.092
No quimioterapia	1 (12.5%)	0 --		
Stupp o más	7 (87.5%)	4 (57.1%)		
Stop	0 --	3 (42.9%)		
Progresión			χ^2	0.072
Radiológica	6 (75.0%)	2 (28.6%)		
Clínica y Radiol	2 (25.0%)	5 (71.4%)		
Patrón			χ^2	0.009
Local, no eloc.	8 (100.0%)	1 (14.3%)		
Eloc / invasión	0 --	5 (71.4%)		
Diseminada		1 (14.3%)		
ECOG 2			χ^2	0.104
Asint. / Leve	8 (100.0%)	5 (71.4%)		
Sintomático	0 --	2 (28.6%)		
Quimioterapia 2ªL			χ^2	0.124
TMZ monoterapia	5 (62.5%)	1 (14.3%)		
BVZ monoterapia	2 (25.0%)	1 (14.3%)		
BVZ combinación	1 (12.5%)	5 (71.4%)		

Tabla 37. Comparación de las variables más relevantes de los grupos a estudio en los gliomas de grado III de la OMS (n=15). Leyenda: Re-Do: reintervención, χ^2 : test chi-cuadrado, T-S: test T de Student, U-MW: test U-de Mann-Whitney, ECOG 1: ECOG tras la primera intervención, ECOG 2: ECOG en el diagnóstico de progresión, TMZ: temozolamida, BVZ: bevacizumab.

4.7.2. Análisis comparativo de supervivencia entre grupos

- OS: La mediana de supervivencia global en el subconjunto de pacientes resultó ser 39 meses (IC95% 30.2-47.7). Según los grupos, la supervivencia global vuelve a ser mayor en el grupo de reintervenidos que en el de tratamiento sistémico [Re-Do: 43 meses, IC95% (23.5-62.4)]; [Quimioterapia 2ª línea: 20 meses, IC95% 17.4-22.5)], sin significación estadística (test *log-rank*, $p=0.161$)
- PFS: La mediana del intervalo libre de progresión fue de 15 meses (IC95% 7.3-29.3), siendo mayor en el grupo de pacientes reintervenidos [Re-Do: 26 meses, IC95% (10.6-46.7)]; [Quimioterapia 2ª línea: 13 meses, IC95% (6.5-25.8)]. La prueba *log-rank* no es significativa ($p=0.183$).
- PPS: La mediana del intervalo de supervivencia en meses tras la progresión se estimó de forma global en 19 meses (IC95% 6.9-31.0). Se observa una tendencia hacia mayores cifras de PPS en el grupo de reintervenidos [Re-Do: 21 meses, (IC95% 14.5-49.5)]; [Quimioterapia 2ª línea: 12 meses, (IC95% 9.4-14.5)], sin significación estadística (test *log-rank*, $p=0.096$).

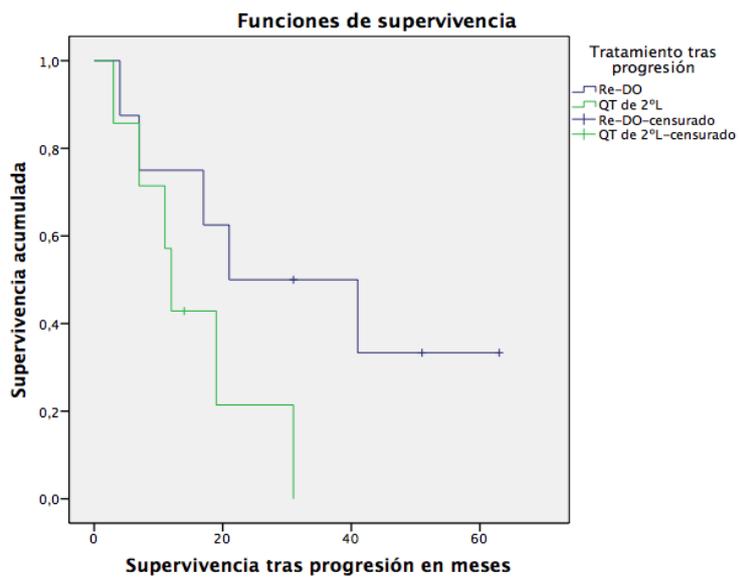
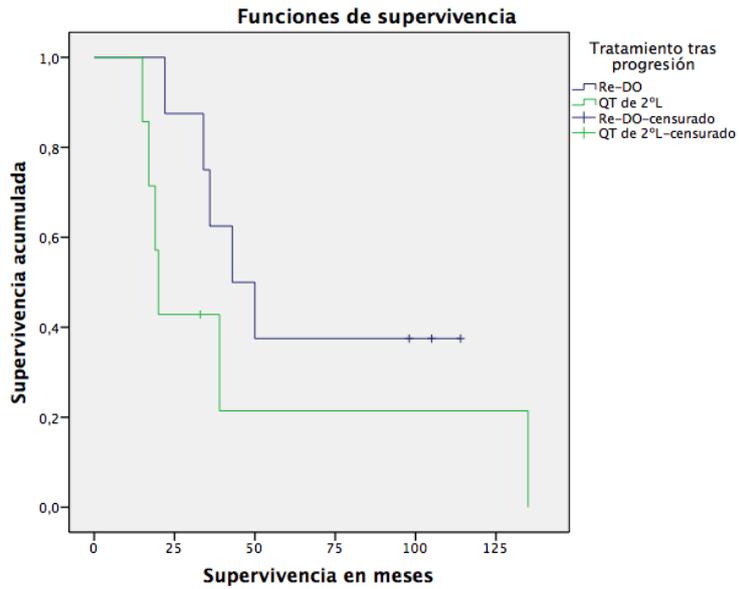


Figura 12. Imagen superior: Funciones de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier para la supervivencia global en función del tipo de tratamiento recibido en la progresión en los pacientes afectados de gliomas grado III de la OMS ($n=15$) ($p=0.161$). Imagen inferior: Funciones de supervivencia para la supervivencia post-progresión. ($p=0.096$). Reintervención (azul); Quimioterapia (verde).

5. DISCUSIÓN

5.1. Resultados generales de la serie

La revisión sistemática sobre la cirugía de rescate en recidiva de glioblastoma del grupo de Montemurro (Montemurro et al., 2016) nos proporciona datos de supervivencia que podemos utilizar a modo comparativo con los de nuestra serie. En dicha revisión, se analizan los resultados de 28 series publicadas, si bien cabe destacar que incluye trabajos con tasas de reintervención muy variables (rango: 12.6-100%), pacientes con características clínicas muy diversas y diferentes protocolos terapéuticos.

-OS: Según la revisión, la mediana de supervivencia global se sitúa en 18.5 meses. En nuestro caso el resultado es de 15 meses (excluyendo previamente las biopsias). Al excluir los pacientes que no se trataron activamente en la progresión, esta cifra asciende hasta los 18 meses.

- PFS: La mediana obtenida por 9 artículos que proporcionaban datos sobre PFS fue de 9.2 meses (rango 6-13.1). Tras excluir las biopsias, en nuestra serie obtuvimos un valor de 8 meses. Al implementar los criterios de exclusión adicionales para la obtención de los grupos de interés, este valor se incrementa hasta los 10 meses, por lo que se encuentra en concordancia con lo revisado en la literatura.

- PPS: Obtenemos asimismo concordancia con los datos proporcionados por 19 artículos de la revisión. En ella, la mediana de supervivencia post-progresión fue de 9.7 meses, mientras que la obtenida en nuestra serie fue de 9 meses, una vez aplicados todos los criterios de exclusión.

5.2. Biopsia frente a resección

De forma análoga a los resultados obtenidos por diferentes publicaciones (Filippini et al., 2008; Hager et al., 2018; Helseth et al., 2010; Ma et al., 2009; Nava et al., 2014), nuestro estudio encuentra diferencias muy significativas en las variables resultado según el tipo de procedimiento indicado ante el nuevo diagnóstico de glioma de alto grado. En los gliomas grado IV de la OMS obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en términos de OS, PFS y PPS entre los pacientes biopsiados y los sometidos a resección (test *log-rank*, $p < 0.001$ en las tres). El estudio de los pacientes con tumores grado III de la OMS otorga resultados parejos, con diferencias muy significativas para la OS ($p < 0.001$), aunque no tanto para la PPS ($p = 0.059$).

Si bien es cierto que la disparidad de los resultados obtenidos podría atribuirse principalmente a las características de los tumores en los que normalmente se indica biopsia (invasión de zonas elocuentes, presentación multicéntrica o compromiso de estructuras diencefálicas), el impacto pronóstico de la citorreducción es claro en el momento del diagnóstico. Es por ello que el objetivo debe ser siempre alcanzar la máxima resección segura en estos pacientes. A pesar de los avances en asistentes intraoperatorios y técnicas microquirúrgicas, es posible que todavía exista una visión nihilística a la hora de tratar esta patología, debido a su mal pronóstico, especialmente en glioblastomas y población de edad avanzada. Por ello, debemos hacer una reflexión y seguir tendiendo hacia un número mayor de indicaciones de cirugías resectivas.

5.3. Factores pronósticos en gliomas de alto grado y sus recidivas

El tratamiento óptimo de la recurrencia de los gliomas anaplásicos o del glioblastoma continúa siendo una decisión clínica controvertida y difícil, permaneciendo todavía como un motivo de debate en la literatura. Las decisiones en este ámbito se realizan de manera individualizada, teniendo en cuenta una serie de variables demográficas, clínicas y radiológicas que han demostrado estar relacionadas con el pronóstico de los enfermos, aunque de manera algo inconsistente en diversas publicaciones. Siguiendo una revisión reciente de la literatura que analiza de forma específica los trabajos de la última década sobre la reintervención en glioblastomas (Robin et al., 2017), observamos que los principales factores pronósticos que impactan sobre la supervivencia son la edad, el estado clínico según las escalas de KPS o ECOG, el tratamiento indicado tanto en el diagnóstico como en la progresión, . La tabla 38 realiza una descripción breve de la metodología y resultados de la mayoría de estudios contenidos en dicha revisión, así como de otros más recientes, con el objetivo de analizar los factores pronósticos más frecuentes observados por los distintos autores. A la derecha, se indican los factores que demostraron asociación con mayor supervivencia (OS, PPS o ambos) y el método estadístico que se utilizó para demostrarlo.

Autor /año de publicación	Descripción	Conclusiones relevantes
(Filippini et al., 2008)	Factores pronósticos en pacientes consecutivos con diagnóstico de GBM (n=676).	Pronóstico en regresión Cox MV para PPS: edad, QT post reintervención, resección inicial (vs biopsia). Re-do no significativo.
(McGirt et al., 2009)	Análisis de factores pronósticos focalizando en el grado de resección (total,	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: grado de resección en ambos

	submáxima o parcial) en gliomas grado III y IV tanto en primointervenciones (n=549) como reintervenciones (n=400).	procedimientos (total o submáxima), edad , estado clínico (KPS>80) y TMZ postop tras ambos procedimientos.
(Ma et al., 2009)	Factores pronósticos para OS en GBM en población china (n=205).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad (<55), estado clínico (KPS>80), resección (vs biopsia), RDT , QT tras primera IQ. Re-do no significativo en regresión Cox MV para OS.
(Helseth et al., 2010)	Factores pronósticos para OS en GBM (n=516).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad (<60), estado clínico (ECOG 0-2), resección (vs biopsia), Stupp (vs sólo RDT). Mayor OS en pacientes Re-do (no estudiado en análisis MV).
(J. K. Park et al., 2010)	Revisión de factores pronósticos en GBM recurrente (n=34). Creación de una escala pronóstica y validación externa en una cohorte distinta (n=109).	Pronóstico en regresión Cox UV para PPS: no invasión de regiones elocuentes , volumen (<50cm ³), estado clínico (KPS>70). No análisis MV.
(Clarke et al., 2011)	Impacto de reintervención en una serie de pacientes elegidos de ensayos clínicos.	Re-do no significativo (no diferencias en OS o PPS superior a 6 meses entre grupos).
(Bloch et al., 2012)	Análisis en ambas cirugías del grado de resección (GTR, STR) en cohorte de pacientes reintervenidos (n=107)	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad , estado clínico en nuevo diagnóstico y en progresión (KPS>70), grado de resección (GTR).
(Gorlia et al., 2012)	Análisis de factores pronósticos en recidiva de GBM en pacientes extraídos de base de datos europea (n=300).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS / PPS: estado clínico (0 en escala de la OMS), lesión única (vs múltiple), volumen (<42mm diámetro), no corticoides (sólo para OS).
(Chaichana et al., 2013)	Impacto en la supervivencia de múltiples reintervenciones.	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: Múltiples reintervenciones . En análisis MV sólo está presente el número de reintervenciones como variable a estudio.
(de Bonis et al., 2013)	Análisis del tipo de tratamiento en progresión en pacientes consecutivos con diagnóstico de GBM (n=76)	Pronóstico en regresión Cox MV para PPS: estado clínico (KPS >70), Re-do + quimioterapia (vs Re-do o quimioterapia únicamente)

(Michaelsen et al., 2013b)	Análisis de factores pronósticos en recidivas de GBM para creación de modelos de supervivencia (n=225).	Pronóstico en regresión Cox UV para OS, PFS y PPS: edad, no corticoides, estado clínico (ECOG 0 vs 1-2). No análisis MV.
(C. K. Park et al., 2013)	Revisión de factores pronósticos en GBM recurrente (n=55). Creación de una escala pronóstica y validación externa en una cohorte distinta (n=96).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: estado clínico (KPS>70), ausencia de invasión ependimaria.
(Nava et al., 2014)	Estudio de factores pronósticos en GBM de nueva aparición y recurrencias de dos cohortes separadas en el tiempo.	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad, estado clínico (KPS>70), unilobar (vs multilobar), resección (vs biopsia), Stupp (vs otros regímenes). Pronóstico para PFS: Stupp. Pronóstico para PPS: edad, QT de 2ª línea. Re-do no significativo.
(Quick et al., 2014)	Revisión de variables que impactan sobre la PPS en pacientes reintervenidos de GBM (n=40).	Pronóstico en regresión Cox MV para PPS: grado de resección (GTR).
(Oppenlander et al., 2014)	Evaluación del valor umbral de resección en GBM recurrente (n=170).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: resección >80%, edad, estado clínico (KPS>70).
(Yong et al., 2014)	Estudio de factores pronósticos en una cohorte de pacientes no seleccionada reintervenidos de GBM (n=97).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad (<40), estado clínico en la progresión (KPS≥90), grado de resección (resto <3cm ³).
(McNamara et al., 2014)	Estudio de factores pronósticos en cohorte de pacientes reintervenidos de GBM (n=107).	Pronóstico en regresión Cox MV para PPS: ratio entre neutrófilos/linfocitos en SP (<4), QT post Re-do. PFS no significativo para PPS.
(Woernle et al., 2015)	Valoración de la escala de Park y cols (C. K. Park et al., 2013), propuesta de modificación incluyendo la edad.	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad (<50), QT 2ª línea (TMZ o BVZ). Re-do no significativo.
(Franceschi et al., 2015)	Estudio comparativo de supervivencia en pacientes reintervenidos (n=102) y no reintervenidos (n=130) en recidiva de GBM:	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad, PFS (>6 meses), metilación MGMT. Re-do no significativo para OS o PPS.
(Scorsetti et al., 2015)	Comparación de tratamientos en recidiva de GBM. Re-do/Re-irradiación + QT 2ª línea (n=21) vs QT 2ª línea (n=22)	Pronóstico en regresión Cox UV para OS: combinación de tratamientos (vs sólo QT 2ª línea). Resto de variables no significativas.

(Kim et al., 2015)	Combinación de varias modalidades de tratamiento en recidiva de GBM. GK (n=29), TMZ (n=31), GK + TMZ (n=28), Re-do + QT 2ª línea (n=38), QT 2ª línea (n=18).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: PFS (>9m), recidiva local, estado clínico (ECOG <2), tipo de tratamiento (GK + TMZ). Pronóstico en regresión Cox MV para PPS: edad (<65), estado clínico (ECOG <2), tipo de tratamiento (GK + TMZ).
(Ening et al., 2015)	Análisis comparativo de factores pronósticos y de supervivencia unicéntrico en recidiva de GBM. Se distinguen dos grupos: la reintervención formó parte del tratamiento (n=38); manejo no quirúrgico (n=62).	Pronóstico en regresión Cox UV para PPS: edad, estado clínico tras la primera intervención y en la progresión (KPS>70), menor número de complicaciones en la cirugía inicial. No análisis MV.
(Tully et al., 2016)	Análisis de factores pronósticos de (n=204) pacientes con recidiva de GBM de los cuales (n=49) se reintervinieron.	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: Re-do, Stupp completo. Re-do no significativo en análisis de subgrupos (excluyendo pacientes mayores o mal estado clínico).
(Chen et al., 2016)	Análisis comparativo de supervivencia en recidiva de GBM entre pacientes reintervenidos (n=20) y manejados con tratamiento no quirúrgico (n=45).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad, estado clínico (KPS, umbral indeterminado); grado de resección (GTR), Re-do.
(Ortega et al., 2016)	Evaluación pronóstica de las reintervenciones múltiples en recidiva de GBM: 1 (n=83), 2 (n=94), 3 (n=25).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad. Número de reintervenciones no significativo.
(Ringel et al., 2016)	Análisis de base de datos de estudio retrospectivo multicéntrico. Selección de pacientes reintervenidos ante recidiva de GBM (n=503).	Pronóstico en regresión Cox UV para OS: edad, PFS. Pronóstico en regresión Cox UV para PPS: edad, grado de resección en Re-do, estado clínico, QT 2ª línea post Re-do.
(Suchorska et al., 2016)	Análisis de base de datos de estudio multicéntrico prospectivo realizado para analizar supervivencia con nuevos esquemas de TMZ en recurrencia de GBM (n=105). Análisis <i>post hoc</i> con creación de grupos en función de si recibieron (n= 71) o no (n= 34)	Pronóstico en regresión Cox MV para PPS: grado de resección en Re-do (GTR vs STR). Re-do no significativo.

	reintervención.	
(Zanello et al., 2017)	Análisis retrospectivo multicéntrico del pronóstico y distintos tratamientos en recidiva de GBM (n=660), focalizando en los mayores de 70a (n=117).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: sexo femenino, grado de resección en 1ª intervención (total o submáxima), waffers carmustina, Stupp, estado clínico (KPS≥70), tratamiento en la progresión (vs BSC). Pronóstico en regresión Cox MV para PPS: grado de resección en 1ª intervención (total o submáxima), waffers carmustina, Stupp, estado clínico en la progresión (KPS≥70), QT de 2ª línea (TMZ o BVZ), tratamiento en la progresión (vs BSC), Re-do. Edad no significativa en ambas.
(Delgado-Fernandez et al., 2017)	Análisis comparativo de supervivencia entre pacientes tratados con reintervención (n=31) o tratamiento no quirúrgico (n=90) en recidiva de GBM.	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad, grado de resección en 1ª intervención (>95%), Stupp, Re-do.
(Van Linde et al., 2017)	Estudio comparativo de estrategias terapéuticas en recidiva de GBM (n=299).	Pronóstico en regresión Cox MV para PPS: edad, sexo femenino, tratamiento en la progresión (vs BSC), lesión única (vs múltiple), no corticoides.
(Perrini et al., 2017)	Análisis de supervivencia en pacientes reintervenidos en recidiva de GBM, focalizando en el grado de resección de la primera y segunda intervención (n=48).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: estado clínico (KPS>80), grado de resección en la reintervención (GTR).
(Audureau et al., 2018)	Análisis retrospectivo multicéntrico de factores pronósticos en recidiva de glioblastoma (n=407).	Pronóstico en regresión Cox MV para PPS: edad, estado clínico (KPS), Re-do, QT 2ª línea (ambos vs a ningún tratamiento en la progresión).
(Sastry et al., 2018)	Estudio comparativo de supervivencia en recidiva de GBM en función del tratamiento recibido: reintervención (n=77), tratamiento no quirúrgico (n=291).	Pronóstico en regresión Cox MV para PPS: estado clínico (KPS≥80), QT 2ª línea (BVZ u otras). Re-do no significativo.
(Mukherjee et al., 2020)	Estudio comparativo de supervivencia en recidiva de	Pronóstico en regresión Cox MV para OS y PPS: edad

	GBM en función del tratamiento recibido: reintervención (n=145), tratamiento no quirúrgico (n=167).	(<60), PFS (>9m), estado clínico (KPS≥80), metilación MGMT.
(Delgado-Fernández et al., 2020)	Estudio del impacto en la supervivencia de la reintervención en recidiva de GBM utilizando metodología tiempo-dependiente.	Pronóstico en regresión Cox MV tiempo-dependiente para OS: Stupp, estado clínico en progresión (ECOG≤2), grado de resección en la primera intervención (GTR). Re-do no significativo.
(Neville et al., 2021)	Estudio comparativo de supervivencia en recidiva de GBM en función del tratamiento recibido: reintervención (n=69), tratamiento no quirúrgico (n=155).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: edad, estado clínico tras la 1ª intervención (KPS), número de reintervenciones.
(Sacko et al., 2021)	Estudio comparativo de supervivencia en recidiva de GBM en función del tratamiento recibido: reintervención (n=59), manejo médico (n=98).	Pronóstico en regresión Cox MV para OS: lesión unilobar, Re-do, cirugía con anestesia general (vs awake craniotomy)

Tabla 38. Análisis de factores pronósticos reportados por publicaciones en recidivas de gliomas de alto grado desde 2008. Leyenda: BSC: tratamiento sintomático, BVZ: bevacizumab, GBM: glioblastoma, GK: radiocirugía estereotáctica con GammaKnife, GTR: resección total, KPS: Karnofsky Performance Scale, MV: multivariante, OS: supervivencia global, PFS: intervalo libre de progresión, PPS: supervivencia post progresión, QT: quimioterapia, RDT: radioterapia, Re-do: reintervención, SP: sangre periférica, STR: resección parcial, Stupp: finalización del régimen de quimiorradioterapia propuesto por Stupp y colaboradores (Stupp et al., 2005), TMZ: temozolamida, UV: univariante, vs:versus.

La revisión exhaustiva de los artículos revisados evidencia de nuevo que la edad y el estado clínico en la progresión (medido por las escalas KPS o ECOG) son los factores más frecuentemente citados en relación con su relevancia pronóstica en la recidiva o progresión de los gliomas de alto grado y específicamente en el glioblastoma. Le siguen en frecuencia el grado de resección en la primera intervención o en la recurrencia y el haber recibido el

esquema Stupp o segundas líneas de quimioterapia tras la recidiva. La edad (<58 años) no mostró impacto pronóstico sobre la OS en nuestra serie [HR 0.83, IC95% (0.57-1.03), p=0.351]. Por el contrario, el estado funcional del enfermo sí que parece tener más influencia sobre la OS, especialmente en el momento de la progresión de la enfermedad [HR 0.54, IC95% (0.37-0.80), p=0.002 en el análisis multivariante]. De forma similar a lo descrito por varios grupos (Delgado-Fernández et al., 2020; Mukherjee et al., 2020; Tully et al., 2016; Zanello et al., 2017), la compleción del régimen de Stupp y la metilación del promotor de MGMT resultaron variables pronósticas para la OS en el análisis univariante. La única variable que mostró influencia pronóstica en el análisis multivariante es el intervalo libre de progresión superior a 10 meses [HR 0.38, IC95% (0.20-0.74), p=0.004 en análisis multivariante].

Otros autores han postulado factores relacionados con la neuroimagen como influyentes sobre la OS o el PFS, no examinados en nuestro trabajo. El grupo americano de Woodroffe señala que la medición volumétrica de las alteraciones de señal en secuencias FLAIR examinados previa a la primo o reintervención no están asociadas con la supervivencia. Por el contrario, el PFS y la OS estarían significativamente afectadas por la cuantía del volumen de captación de contraste preoperatoria, existiendo peor pronóstico a mayor volumen (Woodroffe et al., 2020).

5.4. Modelos pronósticos de supervivencia

Teniendo en cuenta los factores de riesgo clásicos, varios autores han intentado establecer clasificaciones pronósticas y sistemas de puntuación con el objetivo de guiar al facultativo acerca de cuándo indicar un procedimiento de rescate. Tras un análisis multivariante en una cohorte de pacientes afectados de recidiva de glioblastoma, Park y colaboradores encontraron que el estado funcional basado en la escala de Karnofsky y la invasión de la pared ependimaria eran los factores que influían con mayor impacto en la supervivencia. Así, los pacientes con buen estado funcional ($KPS \geq 70$) y sin captaciones patológicas de contraste a nivel ependimario presentaban mejor pronóstico que los pacientes sin estas características. De esta manera, se pretende identificar grupos pronósticos con la finalidad de desarrollar guías terapéuticas (C. K. Park et al., 2013). Otro grupo americano analizó los factores de mal pronóstico de un conjunto de pacientes que fueron sometidos a cirugías de rescate. En este caso, encontraron que la afectación de áreas elocuentes, una puntuación en la $KPS \leq 80$ o un volumen tumoral \geq de 50 cm^3 eran los que más negativamente influían en la supervivencia tras la reintervención. De manera análoga, crean una escala de puntuación (0-3) en función de si estos factores están presentes o no, mostrando los distintos grupos diferencias significativas en los datos de supervivencia. Esta escala, validada en una cohorte independiente, intenta identificar un subgrupo de pacientes que con mayor probabilidad presentará mejores cifras de supervivencia y podrá beneficiarse de una segunda intervención (J. K. Park et al., 2010). Años más tarde, Woernle y colaboradores validaron en su serie la escala previamente citada añadiendo la edad (mayor o menor de 50) como factor pronóstico adicional (Woernle et al., 2015).

Como se ha descrito en el apartado anterior, ni la edad ni el volumen tumoral parecen tener relevancia pronóstica sobre la OS según nuestro modelo univariante de riesgos proporcionales de Cox. Sin embargo, el intervalo libre de progresión, variable más influyente en nuestra serie, no aparece reflejada en ningún modelo o nomograma con intenciones pronósticas. Consideramos que su incorporación a nuevos modelos que tengan como objetivo estimar la supervivencia de estos pacientes podría ser de interés.

5.5. Revisiones sistemáticas y meta-análisis sobre reintervención en gliomas de alto grado

Existen diferentes revisiones de la literatura sobre la reintervención en gliomas de alto grado. Hervey-Jumper y colaboradores realizaron una extensa revisión de artículos publicados durante más de tres décadas. La gran mayoría de estos otorgan a la reintervención un beneficio discreto en la supervivencia; sin embargo, parece que estas diferencias podrían estar influidas por importantes sesgos de selección, como veremos más adelante. Según los autores, los factores que mejor predicen del beneficio de la reoperación son el buen estado funcional medido por la KPS, un intervalo libre de progresión mayor de 6 meses y la resección total de la recidiva (Hervey-Jumper & Berger, 2014). Esto concuerda con nuestros resultados, aunque las conclusiones acerca del impacto que tiene la resección total en reintervenciones sobre el pronóstico vital tienen poco poder estadístico en nuestra serie, como se comentará en el apartado 5.11.

Años más tarde y de forma similar, un grupo italiano revisa la literatura sobre la reintervención, esta vez únicamente en glioblastomas. De los 28 artículos revisados, en 24 la reintervención demuestra un beneficio en términos de supervivencia. Encuentran que los factores clínicos más influyentes son la edad, el grado de resección y el estado funcional en el momento del diagnóstico de la progresión, sugiriendo que los pacientes jóvenes en buen estado clínico serían los mejores candidatos (Montemurro et al., 2016).

La incertidumbre acerca del impacto en la supervivencia que tiene una segunda intervención ha suscitado la elaboración de metanálisis recientemente. Lu y colaboradores realizan una vasta revisión de la literatura hasta 2018, seleccionando 8 estudios observacionales que proporcionan regresiones de Cox multivariantes y HR sobre 1906 pacientes, a los que se practicó una segunda cirugía en un 37% de casos. Encuentran que todos los trabajos analizados, a excepción de uno, otorgan al grupo de reintervenciones HR por debajo de 1 (rango: 0.48- 0.67), es decir, el análisis estadístico revela que pertenecer al grupo “reintervención” es un factor de protección (Lu et al., 2018). Hemos analizado con cautela cada uno de esos estudios:

- Azoulay y col.: Revisión retrospectiva de 180 pacientes, con 69 reintervenciones (38.0%) en los que se analiza la PPS. El grupo de enfermos reintervenidos presenta una PPS de 9.6 meses, mientras que el control, 5.7 ($p < 0.001$). Al revisar las características clínicas de ambos grupos encontramos que los pacientes a los que inicialmente se ha practicado una biopsia se incluyen en el grupo control, generando un probable sesgo de selección. Posteriormente, realizan un análisis de supervivencia de subgrupos en función del tratamiento recibido en la progresión.

Los valores de PPS son mayores en los que recibieron cirugía de rescate seguida de tratamiento complementario (quimioterapia de 2ª línea o re-irradiación); sin embargo, las diferencias entre los que fueron tratados únicamente con cirugía o únicamente con quimioterapia son mínimas (PPS de 6.8 y 6.5 meses respectivamente). Por ello, este estudio es uno de los más adecuados para evaluar el impacto de la reintervención *per se* (Azoulay et al., 2017).

- Delgado-Fernández y col.: Estudio unicéntrico retrospectivo que recopila datos sobre una serie de seis años de casos de recidiva de glioblastoma. Analizan 121 pacientes con una tasa de reintervención del 25%, excluyendo las biopsias diagnósticas. De forma similar a nuestros resultados, se observa que la OS y el PFS son mayores en el grupo de enfermos reintervenidos, sin embargo, no analizan la PPS para esclarecer la influencia pronóstica que tiene la reoperación una vez que se ha producido la progresión. Podría deducirse que la ventaja pronóstica que los autores encuentran pueda deberse a un sesgo de selección y estar influida por un intervalo libre de progresión más largo. De forma contraria a nuestros hallazgos, su modelo de Cox multivariante identifica a la edad, grado de resección, compleción de tratamiento adyuvante y reintervención como variables pronósticas independientes, no siendo significativo el estado funcional (Delgado-Fernández et al., 2017).
- Ortega y col.: Trabajo que analiza las resecciones múltiples en una serie unicéntrica de 8 años. Aunque no analizan la PPS, encuentran que la OS es proporcional al número de resecciones dividiendo a la cohorte en tres grupos (una, dos, tres o más cirugías). Sin embargo, al aplicar la regresión multivariante para ajustar por variables de confusión, se observa que la supervivencia de los

pacientes que han recibido más de una cirugía no presenta significancia estadística ($p=0.55$) con respecto a los no reintervenidos. De nuevo, podría deducirse que los resultados observados están influidos por un sesgo de selección (Ortega et al., 2016).

- Suchorska y col.: Análisis retrospectivo de un estudio prospectivo, multicéntrico y aleatorizado que había sido diseñado para analizar la eficacia de nuevas tandas de TMZ en la recurrencia de glioblastoma. La tasa de reintervenciones es muy alta (71.0%), probablemente debido a que son pacientes con relativo buen pronóstico que han cumplido diversos criterios de inclusión en el estudio inicial. Las diferencias encontradas entre ambos grupos no son significativas al analizar la PPS ($p=0.633$). En consonancia parcial con nuestros resultados, el grado de resección en la reintervención se postula como el factor pronóstico más importante sobre la PPS. Incluso encuentran que los pacientes en los que no se consiguió una resección completa de la recidiva tienen menor supervivencia que los del grupo control (Suchorska et al., 2016).
- Wann y col.: Trabajo que recoge datos de pacientes con diagnóstico de glioblastoma en dos centros australianos. Analizan, de forma pareada, un total de 120 pacientes distribuidos en dos cohortes de 60. Realizan una metodología de “*matching*” de casos y controles en función del grado de resección inicial y la edad. Según puede observarse en las tablas del estudio, las características demográficas y clínicas de los pacientes son bastante homogéneas entre los grupos, aunque incluyen, en el grupo de reintervenidos, casos en los que el grado de resección inicial fue inferior al 50%. En nuestra serie, las resecciones inferiores al 50% suele estar codificadas como biopsias “ampliadas”, como ocurre, por

ejemplo, en tumores multilobares o multicéntricos en los que se reseca una parte con el objetivo de disminuir el efecto masa o la hipertensión intracraneal. De igual modo, tanto la OS como la PPS son significativamente diferentes entre grupos (Wann et al., 2018).

- Woernle y col.: Estudio unicéntrico que analiza una cohorte pequeña, debido a los criterios de exclusión, similares a los nuestros. Aunque la OS es mayor en el grupo de pacientes reintervenidos, el modelo multivariante de Cox para la PPS no muestra la reoperación como factor pronóstico independiente. Únicamente la administración de quimioterapia en la progresión, tiene, en esta serie, impacto pronóstico estadísticamente significativo (Woernle et al., 2015).
- Zanello y col.: Análisis retrospectivo multicéntrico que estudia el tratamiento de las recurrencias en mayores de 70 años. No proporciona datos específicos de supervivencia sobre grupos “reintervención” y control, y hace referencia a que los mayores son infratratados, siendo, el estado funcional y no la edad, el factor más determinante sobre el pronóstico (Zanello et al., 2017).
- Nava y col.: El único trabajo incluido en el metanálisis que reconoce la inefectividad de la cirugía en la recidiva del glioblastoma. En él, se analizan dos cohortes separadas por la introducción del régimen de Stupp (1997-2004 y 2005-2012). Se observa un incremento modesto de la OS y del PFS, así como de la cifra de largos supervivientes en el grupo de la era Stupp. La reintervención se realizó en aproximadamente un 20% de los sujetos del grupo antiguo y en un 33% de los recientes, sin encontrarse ninguna ventaja pronóstica (HRs de 1.05 y 1.02 respectivamente). En cambio, la administración de terapias de segunda línea sí demuestra que es efectiva en términos de supervivencia, en comparación con

tratamiento sintomático exclusivo (HRs respectivos de 0.57 y 0.74) (Nava et al., 2014).

La revisión sistemática de la AANS (*American Association of Neurological Surgeons*) sobre la reoperación en la progresión del glioblastoma publicada en 2014 (Ryken et al., 2014) establece indicación de reintervención para los pacientes que presentan una progresión sintomática (nivel de evidencia clase II). Dicha revisión ha sido actualizada basándose en publicaciones comprendidas entre 2012 y 2019 (Germano et al., 2022). En la actualización se recomienda también con nivel de evidencia clase II, cirugía citorreductora para todos los pacientes en progresión, con el objetivo de mejorar la supervivencia global. Uno de los cuatro trabajos que tienen más peso, según los autores, para dicha afirmación es el del grupo de Suchorska, ya comentando anteriormente (Suchorska et al., 2016). Analizaremos con detalle los tres restantes:

- Hager y col.: Análisis retrospectivo de 59 pacientes mayores de 65 años distribuidos en tres grupos según el tratamiento quirúrgico recibido (biopsia estereotáctica, una resección o más de una). Sus resultados afirman que los pacientes sometidos a biopsias diagnósticas viven significativamente menos que aquellos a los que se indica una cirugía resectiva. Sin embargo, la OS en los pacientes reoperados no es superior a los intervenidos una sola vez (Hager et al., 2018).
- D'Amico y col.: Estudio retrospectivo de doce años en una institución americana que evalúa la seguridad de cirugías iniciales y reoperaciones en glioblastoma, focalizando en los pacientes mayores de 65 años. Sus resultados indican que el número de complicaciones no es mayor en segundas cirugías y que la edad

elevada no debería ser una contraindicación para un tratamiento agresivo en este tipo de tumores. Como vemos, sus resultados no aportan datos comparativos de mejora de la supervivencia en pacientes reintervenidos (D'Amico et al., 2015).

- Yong y col.: Estudio de factores pronósticos en una cohorte de 97 pacientes no seleccionada reintervenidos de GBM. Sus resultados resaltan que el grado de resección en reintervenciones confiere una ventaja pronóstica al compararlos con el grupo de pacientes en los que se evidenció un resto tumoral superior a 3 cm³ en la neuroimagen postquirúrgica. De nuevo, no observamos un grupo comparativo control en el que se indicara un manejo no quirúrgico de la progresión (Yong et al., 2014).

5.6. Diversas publicaciones con metodología de regresión clásica no encuentran en la reintervención un beneficio en la supervivencia

A pesar de todo lo expuesto previamente, también existen series publicadas en la literatura cuyos autores no encuentran un beneficio pronóstico en la reintervención. El grupo italiano de Filippini es uno de los primeros en publicar estos resultados. Su estudio analiza una cohorte de 676 pacientes de la era pre-Stupp (1997-2003) en la que se consiguen altas tasas de seguimiento. La reintervención se indicó en aproximadamente un 25% de los pacientes, sin mostrar significación en el modelo multivariante ya fuese realizada antes de los 9 meses [HR 0.86; IC 95% (0.66-1.12); p=0.256] o pasado este periodo [HR 0.98; IC 95% (0.77-1.25); p=0.860]. Por el contrario, el tratamiento con quimioterapias de segunda línea sí

resultó en una disminución del riesgo proporcional de fallecer, en comparación con no recibir ningún tratamiento (Filippini et al., 2008).

Otra publicación de hace más de una década es la de la Clarke y colaboradores. Analizan dos cohortes, antes y después del año 2005, con tasas de reoperación superiores al 40% en los años más recientes. Ni en los anteriores o posteriores a la era Stupp encuentran diferencias significativas en la OS o intervalos libre de progresión entre el grupo de reoperados y el control (Clarke et al., 2011).

En el trabajo del grupo de De Bonis se observan mínimas diferencias pronósticas entre el grupo de pacientes que recibieron únicamente cirugía en la progresión y el grupo de tratamiento sintomático exclusivo (de Bonis et al., 2013). En el artículo de Nava y colaboradores, sus resultados evidencian un aumento tanto de la OS, como del PFS y la PPS en el grupo de pacientes más recientes y lo atribuyen a la introducción del protocolo Stupp, al refinamiento de los procedimientos quirúrgicos y al aumento de las alternativas terapéuticas disponibles en la progresión. Sin embargo, la reintervención no muestra beneficio terapéutico en ninguno de los grupos (Nava et al., 2014). El artículo de Michaelsen y colaboradores intenta encontrar variables clínicas pronósticas para incluirlas posteriormente en modelos de supervivencia en glioblastoma. Los autores comparan la supervivencia de los pacientes que recibieron quimioterapia de segunda línea frente a los tratados con reintervención y tratamiento sistémico, encontrando diferencias muy sutiles entre los grupos. Concluyen que la supervivencia de los pacientes diagnosticados de glioblastoma y que han sido tratados según el protocolo Stupp, puede predecirse basándose en la edad, el estado clínico según la escala ECOG y la necesidad de corticoesteroides (Michaelsen et al., 2013).

El grupo de Van Linde estudia específicamente los datos de supervivencia, únicamente tras el diagnóstico de la progresión. De forma similar a nuestros resultados, los

pacientes que recibieron algún tipo de tratamiento en la progresión sobrevivieron más que en los que se indicó tratamiento sintomático exclusivo. Tampoco encuentran diferencias en la PPS entre pacientes tratados con reoperación seguida de tratamiento sistémico frente a manejados con tratamiento sistémico directamente (van Linde et al., 2017).

Recientemente, Sastry y colaboradores publican sus resultados sobre una serie de 8 años consecutivos en pacientes con recidiva de glioblastoma. El análisis multivariante identifica al buen estado funcional ($KPS \geq 70$) y a la administración de quimioterapia en la progresión (ya sea bevacizumab u otro agente) como los factores asociados a tener una PPS mayor. De forma similar a nuestros hallazgos, no encuentran que la reintervención o el PFS estén asociados de ninguna forma a una mayor PPS (Sastry et al., 2018).

5.7. Indicaciones quirúrgicas de la reintervención

Aunque los valores de OS, PFS y PPS obtenidos están en concordancia con alguna de las revisiones anteriormente citadas (Montemurro et al., 2016), nuestra tasa de reintervenciones (15.4%) está por debajo de la reportada en la mayoría de trabajos de la literatura, como pudimos observar al revisar los trabajos del metanálisis precedente (Lu et al., 2018), así como en otros estudios (Barbagallo et al., 2008; Ening et al., 2015). Estas diferencias podrían estar justificadas por las diferentes indicaciones entre centros para proceder con una nueva intervención. En comparación con lo revisado en la literatura, valoramos nuestras indicaciones como altamente selectivas. En nuestro caso, no solemos considerar para este tipo de procedimiento a aquellos pacientes en los que previamente se ha realizado una resección parcial. Sin embargo, algunos trabajos reportan el uso de la cirugía de

rescate en estos casos o incluso en pacientes tratados con biopsia como procedimiento inicial (Helseth et al., 2010; Wann et al., 2018). A diferencia de otros grupos (Azoulay et al., 2017), en nuestro centro no suele considerarse la reintervención en aquellos tumores que recidivan a distancia de la cavidad quirúrgica original, en el hemisferio contralateral o de forma multicéntrica. En estos casos, se asume que la enfermedad está muy extendida y que una segunda operación aportará poco beneficio. De igual manera, las reintervenciones múltiples casi nunca se consideran en nuestro comité de neurooncología, aunque algunos autores han encontrado beneficios en términos de OS mayores en subgrupos de pacientes sometidos a resecciones múltiples (Chaichana et al., 2013; Ortega et al., 2016). Por otro lado, algunos artículos o revisiones reportan una incidencia relativamente alta de déficits neurológicos, efecto masa o síntomas compatibles con hipertensión intracraneal previos a la reintervención (Hervey-Jumper & Berger, 2014). En el trabajo de Helseth y colaboradores, un tercio de los pacientes presentaron progresión clínica en forma de empeoramiento de la focalidad neurológica o síntomas de hipertensión intracraneal, mientras que únicamente en un 20% se objetivó una progresión radiológica sin síntomas atribuibles (Helseth et al., 2010). En otro estudio de la era pre-Stupp, el papiledema y la alteración del nivel de conciencia fueron frecuentes en los pacientes reintervenidos (Chang et al., 2003). Estos hallazgos contrastan con nuestro análisis, en el que la mayoría de reintervenciones se indicaron en pacientes con progresión radiológica sin deterioro clínico evidente y sin necesidad de aumento de la dosis de corticoesteroides (24 pacientes, 73.0%).

5.8. El rol de la reintervención como tratamiento único

De acuerdo a lo expuesto en apartados anteriores, existen multitud de artículos que no asocian a la reintervención con un beneficio en la supervivencia (Clarke et al., 2011; de Bonis et al., 2013; Filippini et al., 2008; Franceschi et al., 2015; Nava et al., 2014; van Linde et al., 2017; Sastry et al., 2018). En algunos de ellos, los pacientes reintervenidos no recibieron ningún tratamiento complementario tras la cirugía, lo que permite analizar el rol de la reintervención como tratamiento único.

En el trabajo de De Bonis y colaboradores, se analizan las diferencias que existen en la PPS dividiendo a la población en cuatro grupos en función del tratamiento recibido en la progresión. Al igual que en el artículo de Azoulay (Azoulay et al., 2017), existe un subgrupo de pacientes que únicamente fue tratado con cirugía de rescate, en el que no se detectan diferencias significativas con respecto al subgrupo tratado directamente con quimioterapia. La PPS de pacientes tratados únicamente con cirugía fue de 6 meses, mientras que la de los sujetos que recibieron sólo tratamiento sistémico fue de 8 meses. Se observa un incremento de la PPS (14 meses, test *log-rank*; $p=0.01$) en sujetos que reciben ambos tratamientos (de Bonis et al., 2013). Estos estudios proporcionan una idea del discreto impacto de la reintervención como única herramienta terapéutica en la progresión. Dicho análisis no se ha realizado en nuestra serie, ya que únicamente 5 sujetos del grupo de reintervenciones no fueron tratados posteriormente con quimioterapia adicional, limitando la validez estadística del resultado.

5.9. Asumir una ventaja pronóstica en el grupo de reintervenidos analizando únicamente los datos de supervivencia global: posible sobreestimación

El concepto de beneficio en términos de supervivencia para el paciente es variable según los estudios. Algunos artículos concluyen que existe un mejor pronóstico en el grupo de reintervenidos si las cifras de OS son mayores en este, pero no miden la supervivencia desde el momento del diagnóstico de la progresión, es decir la PPS (Delgado-Fernández et al., 2017; Ening et al., 2015). Eludir este matiz al evaluar un tratamiento que se indica en la progresión, producirá conclusiones sesgadas desde nuestro punto de vista.

Por ejemplo, un estudio italiano que evalúa una cohorte de 232 pacientes con tasas de reintervención algo superiores a las nuestras obtiene resultados casi idénticos a los expuestos en este trabajo (Franceschi et al., 2015). La diferencia de OS entre grupos fue de 25.8 versus 18.6 meses ($p=0.003$) favorable al grupo de reoperados, mientras que la de nuestra serie 25.0 versus 17.0 meses ($p=0.004$). Las diferencias en la PPS, sin embargo, no resultan significativas (9.6 vs 7.5 meses; $p=0.3$ en el estudio citado y 9.0 vs 8.0 meses; $p=0.143$ en nuestra serie).

El análisis de la PPS parece indispensable bajo nuestro criterio, ya que, a pesar de las diferencias observadas entre grupos con respecto a la OS, observamos que el tipo de tratamiento en la progresión tiene un impacto menor en la PPS. Nuestro trabajo tampoco demuestra ninguna asociación estadística entre el intervalo libre de progresión y la PPS. En el análisis univariante, los pacientes con un PFS superior a 10 meses (mediana de nuestra serie) tienen aproximadamente el mismo riesgo de fallecimiento tras la progresión que aquellos con PFS inferiores a este punto de corte [HR 0.96; IC 95% (0.65-1.40); $p=0.836$].

Estos resultados podrían traducir que los pacientes con PFS mayores suelen completar el esquema Stupp y recibir algún tipo de tratamiento oncológico en la progresión. Estos “mejores candidatos” son los que presentarían cifras de OS mayores, mientras que una vez diagnosticada la recurrencia de la enfermedad, el tipo de tratamiento elegido podría tener menor relevancia clínica en el pronóstico general del paciente.

5.10. La importancia del intervalo libre de progresión

El intervalo libre de progresión (PFS) se postula en este trabajo como el factor pronóstico más influyente sobre la OS en nuestro grupo, incluso superando al estado funcional del paciente. En el modelo univariante, el PFS superior a 10 meses es la variable con mayor significación estadística para la OS [HR 0.39; IC 95% (0.26-0.58); $p < 0.001$]. Le sigue en importancia la compleción de todos los ciclos de TMZ adyuvante [HR 0.48; IC 95% (0.32-0.71); $p < 0.001$]. Al aplicar la regresión multivariante, “PFS superior a 10 meses” es la única variable que conserva su impacto pronóstico de forma independiente [HR 0.38; IC 95% (0.20-0.74); $p = 0.004$]. Se observa también una tendencia hacia menor riesgo de fallecer para “puntuación de 0 ó 1 en la escala ECOG”, aunque sin significación estadística [HR 0.67; IC 95% (0.44-1.01); $p = 0.061$]. Consideramos que “finalizar el régimen de Stupp” es una variable subrogada del intervalo libre de progresión, ya que esta pierde su relevancia en el modelo multivariante [HR 0.88; IC 95% (0.46-1.68); $p = 0.709$].

Los pacientes pertenecientes al grupo de reintervención tienen intervalos libres de progresión significativamente mayores que los del grupo control (test log-rank; $p = 0.002$),

hecho que es constatado en multitud de trabajos (Delgado-Fernández et al., 2017; Ening et al., 2015; Hervey-Jumper & Berger, 2014; Ortega et al., 2016; van Linde et al., 2017). Estos resultados pueden reflejar las indicaciones para cirugías de rescate, ya que, en general, no suelen ofrecerse en progresiones radiológicas o clínicas con intervalos de progresión cortos. Esta cuestión es motivo de debate en multitud de comités multidisciplinares, ya que no existen estudios con adecuada calidad que determinen a partir de qué punto de corte debe indicarse el tratamiento quirúrgico de la recurrencia. Algunos grupos manejan cifras arbitrarias de 6, 9 o en centros más clásicos, 12 meses. Nuestra práctica clínica habitual (aunque no en todos los casos) es la de ofrecer al paciente un segundo procedimiento una vez haya finalizado la fase de adyuvancia con TMZ, mientras que, en los casos en los que diagnostica una progresión durante el tratamiento con TMZ, solemos optar por un cambio en el régimen quimioterapéutico. Es por ello que los grupos a comparar presentan diferencias muy significativas con respecto a la dosis total de quimioterapia recibida tras la primera intervención (test χ^2 ; $p=0.001$), y que, finalizar el régimen de Stupp parece ser una variable subrogada del intervalo libre de progresión en nuestro modelo multivariante.

Además, el PFS mantiene su impacto pronóstico independiente en el análisis multivariante realizado, considerando la reintervención como variable tiempo-dependiente en la regresión de Cox [HR 0.43; IC 95% (0.22-0.83); $p=0.012$], junto al buen estado clínico (ECOG 0-1) en la progresión [HR 0.57; IC 95% (0.37-0.88); $p=0.011$].

5.11. Grado de resección como variable pronóstica

El grado de resección en las primeras cirugías y en las reintervenciones ha sido postulado como uno de los factores pronósticos más importantes en una gran cantidad de estudios. El grupo de Yong estudia específicamente esta variable, observando que el riesgo de fallecer es cinco veces mayor en pacientes con residuos tumorales de más de 3 cm³ de volumen en comparación con las resecciones completas (Yong et al., 2014).

El análisis retrospectivo de Quick y colaboradores postula la resección completa en la reintervención como el único factor que influye de forma independiente sobre la PPS tras realizar un análisis de regresión multivariante, no aconteciendo así con el estado funcional, el estado de metilación del promotor de *MGMT* o la duración del intervalo libre de progresión (Quick et al., 2014). Resultados similares son aportados por trabajos uni y multicéntricos, que exponen el discreto beneficio para la supervivencia que supone una resección completa en la reintervención tras una exéresis inicial incompleta (Bloch et al., 2012; Ringel et al., 2016). En nuestra serie, este análisis no procede, ya que la mayoría de los enfermos reintervenidos fueron pacientes con resección completa en la primera intervención (29 casos, 87.8%). Estudios recientes de naturaleza prospectiva encuentran una ligera ventaja pronóstica con umbrales de resección en reintervenciones más bajos (por encima del 80%) (Mukherjee et al., 2020). Además, existe un artículo que describe la relación entre la resección completa y la mejoría en escalas que evalúan la calidad de vida, además del aumento de supervivencia (Suchorska et al., 2016).

En nuestra serie, hemos dicotomizado el grado de resección entre total (GTR) o subtotal (STR), si se describía la presencia de alguna alteración de señal captante de contraste en la neuroimagen postoperatoria, tanto tras la primointervención como la reoperación.

La tasa de resecciones totales en segundas cirugías fue del 87.8% (29 casos) y es mucho mayor que la reportada en otros trabajos (Barbagallo et al., 2008; de Bonis et al., 2013; Mukherjee et al., 2020; Quick et al., 2014; Ringel et al., 2016), que oscilan entre un 33 y un 72%. Estas diferencias podrían explicarse por las indicaciones altamente selectivas mencionadas previamente o el uso de asistentes quirúrgicos como la RM intraoperatoria o la fluorescencia oncológica proporcionada por el 5-ALA.

La variable “grado de resección en reintervenciones” no fue incluida en el análisis multivariante de nuestro trabajo, debido al bajo número de pacientes en nuestra serie con resecciones incompletas o no evaluadas (n=4). Además, el objetivo del trabajo es comparar a los pacientes reintervenidos con un grupo en el que no se realiza este procedimiento, y en el que, por tanto, no se evalúa ningún tipo de resección. Por ello, nuestro análisis no pretende demostrar que la resección total en cirugías de rescate suponga un beneficio pronóstico. Sin embargo, en el análisis univariante realizado en el grupo de reintervenidos, la “resección completa en la reintervención” resultó ser un factor de protección estadísticamente significativo [HR: 0.24, IC 95% (0.07-0.74), p=0.014].

5.12. La importancia del análisis multivariante para la búsqueda de variables subrogadas

Nuestros resultados arrojan grandes diferencias al evaluar los factores pronósticos en función de si se utilizan regresiones de Cox uni o multivariantes. El análisis univariante para supervivencia global identificó la metilación del gen *MGMT*, la finalización de esquema Stupp, el estado funcional en la progresión, el intervalo libre de progresión mayor de 10 meses y la reintervención como variables con influencia estadísticamente significativas. Sin embargo, en el análisis multivariante, sólo el intervalo libre de progresión mayor a la mediana permaneció como variable pronóstica estadísticamente significativa, postulando a las demás variables como subrogadas (el grado de metilación del promotor del gen *MGMT* no se incluyó en el análisis multivariante por carecer de esta información en un número importante de casos).

Aún así, diversas publicaciones científicas adjudican a la reoperación la propiedad de aumentar la supervivencia basándose únicamente en resultados estadísticos procedentes de regresiones univariantes (Ening et al., 2015; Michaelsen et al., 2013b; J. K. Park et al., 2010; Ringel et al., 2016; Scorsetti et al., 2015). De seguir este planteamiento analítico, nuestras conclusiones serían diametralmente opuestas a las expuestas, ya que, según el análisis univariante, se asume que la pertenencia al grupo “reintervención” está ligado a un menor riesgo de fallecer de forma significativa [HR: 0.54; IC95% (0.34-0.83); p=0.006].

5.13. Discusión de las complicaciones

Con respecto al tipo de procedimiento, concluimos que no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a las complicaciones. Sin embargo, las puntuaciones obtenidas en la escala ECOG tras el ingreso hospitalario fueron significativamente más altas en los pacientes biopsiados, y afirmamos que las indicaciones de la biopsia obedecieron más a factores relacionados con la localización del tumor que al estado funcional del paciente. Esta discrepancia puede explicarse por que nuestra serie no analiza el ECOG preoperatorio, que puede ser más elevado en los pacientes biopsiados antes del procedimiento. Estos tumores son más proclives a invadir áreas elocuentes y producir focalidad neurológica, impactando sobre el valor de la escala ECOG.

Con respecto a las reoperaciones, aunque algunos artículos comunican un índice de complicaciones permanentes de hasta un 30% en pacientes sometidos a reintervenciones (Sacko et al., 2021), nuestra tasa de eventos adversos en segundas cirugías está en consonancia con lo reportado en otros trabajos (Ening et al., 2015; Ringel et al., 2016) y dentro de porcentajes aceptables en la literatura. La revisión sistemática de Robin y colaboradores en recidiva de glioblastoma estima una tasa de complicaciones aproximada de 18.9% al cotemplar los datos de las 16 publicaciones que reportaban eventos adversos. Sin embargo, se aprecia una heterogeneidad entre los distintos estudios a la hora de catalogar las complicaciones, ya que en algunos casos únicamente se cotemplan los déficits permanentes o las complicaciones que requirieron ingreso en la UCI u otro procedimiento posterior. En nuestro caso, se registró una complicación en un tercio de los pacientes reintervenidos (11 casos, 33.3%), aunque la gran mayoría fueron leves y no requirieron ningún tratamiento

invasivo para su manejo. Es por ello que los porcentajes no son superponibles y la comparativa debería realizarse en base a una clasificación de complicaciones previamente validada. Según la clasificación de Landriel-Ibáñez (Ibáñez et al., 2011), la mayoría de las complicaciones fueron catalogadas como grado I (8 pacientes, 24.2%), mientras que en 3 pacientes se produjeron eventos catalogados como grado II (9.0%). No se produjo ningún fallecimiento (complicación grado IV) como causa directa o indirecta de la reintervención en nuestra serie.

Por otro lado, el análisis de Ringel y colaboradores encuentra un ligero aumento en el porcentaje de complicaciones en segundos procedimientos al compararlos con la cirugía inicial (5% de eventos adversos no neurológicos, 7% de déficits transitorios y 5% de déficits permanentes en primeros procedimientos frente al 7%, 9% y 8% respectivamente en reintervenciones) (Ringel et al., 2016). Nuestros resultados no parecen evidenciar esta tendencia. Al comparar las primointervenciones con intención radical (n=214) con los segundos procedimientos (n=33), observamos algún tipo de complicación en un 38.3% y 33.3% respectivamente. El tipo de evento adverso más frecuente es el de grado I en ambos procedimientos y no se observa un aumento de complicaciones más graves en las reintervenciones, de hecho, sólo se registraron complicaciones de grado III o IV en las primointervenciones. Esta observación podría estar justificada una vez más por la alta selectividad de los casos considerados para reintervención en términos de características clínico-radiológicas.

Por tanto, a pesar de buenos resultados clínicos en segundas intervenciones de glioblastoma (indicaciones más selectivas, altos porcentajes de resección completa y

complicaciones en rango aceptable), nuestro análisis no demuestra una ventaja en la supervivencia, de hecho, como hemos visto en el apartado de resultados y examinaremos más adelante, al considerar la reintervención como una covariable tiempo-dependiente parece ser un factor de riesgo (HR 1.76; $p=0.017$).

5.14. Comparación de los grupos de interés

La creación de grupos comparables es una de las dificultades más importantes a la hora de evaluar el beneficio clínico de las reintervenciones en casos de glioblastoma. Esto es debido a que la situación clínica de cada paciente es muy variable y está bajo la influencia de multitud de factores: estados funcionales diferentes que pueden variar durante el curso de la enfermedad, uso de diferentes tipos de tratamiento sistémico o toxicidades derivadas de la quimioterapia que obligan a suspender, postponer o disminuir las dosis óptimas, entre otros. Con el objetivo de hacer lo más semejante posible los grupos a comparar, hemos realizado una cuidadosa selección de pacientes. Durante los 15 años de revisión, 350 pacientes han sido diagnosticados de glioblastoma en nuestro centro y tras aplicar los criterios de exclusión, únicamente hemos realizado el análisis estadístico inferencial con 117 (33.4%). Sólo se han valorado los casos que han recibido tratamiento activo en la progresión, pero excluyendo previamente los pacientes diagnosticados mediante biopsia como tratamiento quirúrgico inicial, debido a que, inherente a la localización o extensión de su lesión, estos enfermos presentan datos pronósticos significativamente peores (15 meses frente a 5 meses de mediana de OS en intentos de resección completa frente a biopsias; test log-rank, $p<0.001$).

Como podemos analizar en la tabla 15, al comparar las variables clínicas más relevantes entre los grupos, encontramos que no hay diferencias significativas en la edad, sexo, antecedentes médicos, volumen tumoral, complicaciones o estado funcional tras la primera intervención. Tampoco hallamos disparidades en ningún aspecto inmunohistoquímico o de biología molecular estudiado (*p53*, *IDH-1*, *Ki67*, *EGFR*, metilación promotor *MGMT*; tabla 16). Sí que se observan diferencias en el grado de resección inicial, ya que la mayoría de los pacientes en el grupo “reintervención” recibieron una resección completa en la primera intervención (test χ^2 ; $p=0.036$). También se detectan diferencias en el momento del diagnóstico de la progresión, ya que más sujetos de la cohorte de reintervenidos presentan una recidiva descubierta únicamente por neuroimagen de seguimiento (test χ^2 ; $p=0.020$) y por tanto están asintomáticos o con síntomas leves (test χ^2 ; $p=0.001$). Por último, la compleción del esquema Stupp es muy diferente entre grupos (test χ^2 ; $p=0.001$); esto puede deberse a la diferencia que existen entre ellos con respecto al intervalo libre de progresión (mediana de 12 meses en reintervenidos frente a 9 meses en grupo control; test log-rank; $p=0.002$). El régimen de Stupp suele completarse a los 10-12 meses del diagnóstico, ya que comienza aproximadamente al mes de la intervención, después le siguen 2 o 3 meses en los que se realiza la fase de concomitancia y la neuroimagen de control de tratamiento, para posteriormente cumplir la fase de adyuvancia con TMZ durante 6 meses. Es por ello que en los pacientes en los que la recidiva se detecta durante la fase de adyuvancia (PFS igual o menor a 9 meses), se realiza un cambio de tratamiento y son categorizados como “Stupp incompleto”. Debido a las indicaciones descritas anteriormente, estos pacientes no suelen considerarse en general para nuevas cirugías y pertenecerán al grupo control.

Sin embargo, en la literatura encontramos trabajos que incluyen a los pacientes en los que se desestimó la cirugía resectiva en el momento del diagnóstico o a aquellos candidatos a tratamiento sintomático exclusivo en la progresión (Ening et al., 2015; Chen et al., 2016; Wann et al., 2018; Woernle et al., 2015) dentro del grupo de no reintervenidos, incurriendo probablemente en un sesgo de selección y sobreestimando las diferencias de supervivencia entre grupos (Delgado-Fernández et al., 2017).

5.15. El sesgo de selección y el sesgo temporal

Uno de los motivos que podría explicar la discrepancia de resultados que existe en la literatura es la posibilidad de sesgos de selección de los pacientes, en los que los mejores candidatos son seleccionados para procedimientos de rescate (Chaichana et al., 2013; Chen et al., 2016; Delgado-Fernández et al., 2017; Ening et al., 2015; Helseth et al., 2010; Tully et al., 2016). Por otro lado, la ventaja en términos de OS para los pacientes reintervenidos podría estar en relación con características propias del paciente y/o del tumor que con el procedimiento propiamente dicho. Esta cuestión fue analizada por Tully y colaboradores. En su trabajo, estudian una serie de pacientes con diagnóstico de glioblastoma, tratados en dos centros australianos durante 4 años. Los autores observan una diferencia estadísticamente significativa para OS entre el grupo de pacientes reintervenidos en la recidiva y el grupo de no reintervenidos (20.1 vs 9 meses; $p=0.0001$). La reintervención persiste además como factor de protección en su análisis multivariante [HR: 0.646, IC 95% (0.543-0.922), $p=0.016$]. Sospechando un sesgo de selección, los autores proponen la creación de subgrupos y excluyen de ambos grupos los casos que presentan características clínicas poco favorables,

tales como edad avanzada o puntuaciones bajas en escalas de valoración funcional. Su trabajo revela que, al excluir estos casos, la reintervención desaparece como variable pronóstica de los modelos uni y multivariante (Tully et al., 2016).

Otro aspecto que tiene en cuenta en nuestro trabajo es la importancia del sesgo temporal. Diferentes estrategias han sido evaluadas en la literatura para combatir este tipo de error y con frecuencia son empleadas en otras áreas de conocimiento médico, como, por ejemplo, en el estudio de la eficacia de la terapia adyuvante en cáncer de mama (Jatoi et al., 2011) o creación de modelos pronósticos cáncer de colon (Bolard et al., 2001). La gran mayoría de estudios analizados en esta tesis consideran la reintervención como una variable fija en el tiempo, al igual que más de un 40% de los trabajos publicados en revistas médicas de alto impacto según un estudio que evaluó específicamente el número de publicaciones que incurrieran en este tipo de error (van Walraven et al., 2004). Los sesgos temporales ocurren cuando los datos relativos a la exposición a una determinada variable (en nuestro caso, la reintervención) se conocen al inicio del análisis. Además, es posible estimar la dirección del sesgo en función de los resultados; por ejemplo, si la exposición a ese factor no produce ningún efecto en el tiempo, el análisis sesgado temporalmente mostrará una prolongación; si existe un efecto de prolongación de la supervivencia, el análisis con sesgo evidenciará una prolongación todavía mayor; pero, si, por el contrario, existe un efecto de aceleración (menor supervivencia), el análisis con sesgo mostrará, al menos, un efecto menos pronunciado. El artículo de Beyersmann y colaboradores demuestra mediante fórmulas simples este tipo de sesgo al estudiar la neumonía adquirida en una Unidad de Cuidados Intensivos en un centro asistencial de Berlín durante un año. De forma similar a nuestro trabajo, realizan dos tipos de análisis; el primero considera la infección como una variable fija en el tiempo, de manera que

únicamente los pacientes que no sufren este evento adverso están incluidos en el grupo control, el segundo; la considera como una variable tiempo-dependiente de manera que todos los pacientes están incluidos al inicio del estudio en el grupo control y las transiciones de grupo se producen únicamente en el momento en el que se desarrolla la exposición. Al tratar a la neumonía nosocomial como variable tiempo-dependiente se observa un aumento de la estancia en UCI, sin embargo, si este factor no se tiene en consideración, se observa un aumento de la estancia todavía mayor, probablemente debido al sesgo de temporalidad (Beyersmann et al., 2008).

El tiempo que transcurre desde el diagnóstico hasta la recurrencia de la enfermedad y la eventual reoperación no es predecible, y por ello, este procedimiento es una variable de naturaleza tiempo-dependiente. Por tanto, ignorar el momento de la exposición en una variable dependiente del tiempo, como es un procedimiento quirúrgico puede generar resultados erróneos. Algunas publicaciones recientes tienen en cuenta este sesgo y consideran el impacto pronóstico de las reoperaciones en glioblastoma utilizando regresiones de Cox con covariables dependientes del tiempo. Goldman y colaboradores detectaron que, con el uso de la metodología clásica, la reintervención estaba asociada con un menor riesgo de fallecer [HR: 0.62; IC 95% (0.43-0.90); $p=0.001$] y que el empleo de regresiones con covariables tiempo-dependientes modificaba completamente las conclusiones, al evidenciar que este procedimiento podía tratarse de un factor de riesgo asociado a mayor mortalidad [HR: 2.19; IC 95% (1.47-3.28); $p<0.001$] (Goldman et al., 2018). Otro trabajo de un grupo español con cohortes de tamaño muy similar a nuestro estudio realiza un estudio retrospectivo en glioblastomas durante once años, excluyendo previamente las biopsias del análisis. Realizan diferentes métodos estadísticos tiempo-dependientes como el test de Simon-Makuch (R.

Simon & Makuch, 1984) o el “*landmarking test*”, así como regresiones de Cox clásicas y tiempo-dependientes. El “*landmarking test*” es otra herramienta matemática que consiste en la creación percentiles de tiempo y la valoración de las diferencias de supervivencia entre grupos en ese momento. Los pacientes que componen el grupo varían en el percentil a estudio en función de si se han expuesto al factor a estudio (en este caso la reintervención). En este artículo se describe una diferencia inicial en la supervivencia global estadísticamente significativa entre grupos (22.2 versus 11.8 meses; test log-rank; $p < 0.001$). La regresión de Cox clásica también evidencia a la reoperación como una variable con HR significativo para la OS [HR: 0.649; IC 95% (0.434-0.97); $p = 0.035$]. Sin embargo, aplicando test estadísticos para corregir los sesgos temporales, se observa que las diferencias son insignificantes [regresión de Cox tiempo-dependiente para OS: HR: 0.997, IC 95% (0.976-1.018); $p = 0.750$] o incluso, que los datos de supervivencia son peores en el grupo de reintervenidos (Delgado-Fernández et al., 2020).

La generalización de sesgos de origen temporal en la mayoría de trabajos que abordan esta cuestión ha suscitado la creación de un meta-análisis reciente. En él, se analizan 21 artículos que proporcionan datos de supervivencia en recurrencia de glioblastoma para interpretar los datos de una manera clásica o considerando la reoperación como una covariable dependiente del tiempo. De nuevo, se observa una inversión de los resultados al evaluar la reintervención con metodología estadística tiempo-dependiente. Al considerarla como covariable fija en el tiempo se observa que está asociada con mejor OS [HR: 0.66; IC 95% (0.61-0.71); $p < 0.001$] y PPS [HR: 0.70; IC 95% (0.57-0.88); $p < 0.001$]; sin embargo, el efecto beneficioso sobre la supervivencia desaparece si se analiza como covariable tiempo-

dependiente [OS HR: 2.19; IC 95% (1.47-3.27); $p < 0.001$ y PPS HR: 0.95; IC 95% (0.82-1.10); $p = 0.51$] (Y.-H. Zhao et al., 2019).

Nuestros resultados evidencian el mismo fenómeno, pese a que en el análisis multivariante clásico ya se obtenía una pérdida de la significación estadística. Recopilamos los resultados de los modelos de Cox realizados en nuestra serie y centrándonos específicamente la reoperación, encontramos:

- OS: Los resultados del análisis univariante clásico muestran la reintervención como factor asociado de manera estadísticamente significativa a mayor supervivencia [HR: 0.54; IC 95% (0.34-0.83); $p = 0.006$]. La regresión multivariante la asocia con una tendencia hacia mayor supervivencia, pero sin significación estadística y apunta a que la relación encontrada en el modelo univariante podría ser debida a la presencia de otras variables subrogadas con mayor impacto pronóstico [HR: 0.75; IC 95% (0.46-1.21); $p = 0.248$]. En la regresión de Cox considerando a la reintervención como variable tiempo-dependiente, esta resulta ser factor de riesgo estadísticamente significativo [HR: 1.76; IC 95% (1.10-2.80); $p = 0.017$].
- PPS: La reintervención no demuestra influencia sobre la PPS (HRs de 0.73 y 0.76 en la regresión uni y multivariante respectivamente, con valores de p no significativos e intervalos de confianza que incluyen el valor 1). Considerando la reintervención como variable tiempo-dependiente, tampoco observamos un impacto pronóstico significativo sobre la PPS [HR: 0.98; IC95% (0.77-1.13), $p = 0.531$].

5.16. ¿Debemos contraindicar las reintervenciones por suponer un factor de riesgo?

A pesar de los resultados obtenidos, la reintervención quirúrgica no debe, en ningún caso, ser desterrada de entre las opciones terapéuticas a plantear en el paciente con recidiva de glioblastoma. Es importante recordar que la cirugía también tiene un papel en el alivio sintomático para el paciente, mejorando su calidad de vida al disminuir el edema asociado, la hipertensión intracraneal o los requerimientos de corticoesteroides. La consideración de la reintervención con metodología tiempo-dependiente en los análisis de supervivencia debería ser la norma de los nuevos trabajos que evalúen la eficacia de intervenciones múltiples en la progresión del glioblastoma, con el fin de evitar sesgos temporales.

Postulamos diversas teorías para explicar la ausencia de beneficio de la reoperación sobre la supervivencia global o la supervivencia post-progresión de los pacientes reintervenidos. Una de ellas podría radicar en que un nuevo procedimiento obliga a suspender durante las 4 semanas previas, el tratamiento con bevacizumab; y posteriormente, se produce también un retraso en el inicio del tratamiento complementario. Así mismo, algunos trabajos demuestran que el tiempo libre de progresión influye de manera significativa sobre el valor pronóstico de la reintervención, es decir aquellos pacientes con un fenotipo tumoral más agresivo serán los que presenten recidivas más tempranas y, en ellos, la reintervención probablemente tenga un escaso papel (Y.-H. Zhao et al., 2019). Otro factor a considerar es que el objetivo de resección en reintervenciones suele ser la zona captante de contraste, sin tener en cuenta los cambios de señal adyacentes en secuencias T2 o FLAIR, que son más difusos y por tanto más complejos de tratar en la resección macroscópica. Es posible que, en

el momento de la reintervención, un nuevo procedimiento quirúrgico no tenga ningún efecto sobre la llamada enfermedad microscópica, que podría estar ya extensamente diseminada a través de las comisuras interhemisféricas o de las fibras blancas largas y cortas en “u”, impactando de forma nula o incluso negativamente sobre el pronóstico.

5.17. Resección supramáxima

La consideración del área de alteración de señal adyacente a la captación de contraste en secuencias T1 como enfermedad ha suscitado una nueva tendencia en el campo de la neurooncología de los gliomas de alto grado, y algunos autores hablan de la resección supramáxima, que tiene como objetivo mejorar el pronóstico del enfermo al incidir quirúrgicamente sobre ella. Existen varias revisiones sistemáticas y meta-análisis recientes que han evaluado su utilidad en glioblastoma de nuevo diagnóstico. Aunque los estudios incluidos no gozan de buena calidad, parecen evidenciar que la extirpación del área adyacente a la zona captante podría mejorar tanto la OS como el PFS, sin un aumento en la tasa de complicaciones (Dimou et al., 2020; C. Jackson et al., 2020). Sin embargo, la definición anatómica o radiológica de lo que se considera resección supramáxima no está bien delimitada ni es homogénea entre los estudios, por lo que se antoja necesaria la creación de estudios bien diseñados, prospectivos y aleatorizados. Recientemente, el grupo de Shah encuentra diferencias significativas de supervivencia en pacientes a los que les practica una lobectomía en casos de glioblastoma que asientan sobre parénquima no considerado elocuente al compararlos con una resección clásica del área captante (Shah et al., 2020). De todas maneras, esta práctica se está valorando únicamente en glioblastomas de nueva

aparición y todavía no se ha publicado ningún trabajo que haya estudiado su impacto en las recurrencias.

5.18. La reintervención en pacientes de edad avanzada

Los gliomas de alto grado se presentan con frecuencia en pacientes de edad avanzada. Cada vez existen más publicaciones científicas que analizan específicamente la repercusión de las distintas terapias y el pronóstico en este grupo de edad, definiéndolo arbitrariamente como superior a los 65 o 70 años, según los autores. En general, la literatura reporta resultados e índices de complicaciones similares a los encontrados en los pacientes más jóvenes, por lo que no postulan a la edad como factor limitante de un tratamiento agresivo en la progresión, si está indicado por otros factores clínicos o radiológicos (D'Amico et al., 2015; Zanello et al., 2017). Hemos analizado las diferencias en términos de supervivencia y complicaciones de los 4 pacientes reintervenidos en nuestra serie con más de 70 años. Aunque el número es muy escaso para poder establecer conclusiones definitivas, observamos pocas diferencias en relación con el grupo de sujetos más jóvenes. Un paciente presentó una complicación catalogada como grado I, lo que supone una tasa del 25% que está en consonancia con el 30.3% de los controles de menores de 70 años. Con respecto al beneficio de sobrevida, el test de rango logarítmico tampoco encuentra diferencias significativas ($p=0.345$). De nuevo, es posible que la visión de un pronóstico ominoso y el carácter paliativo de estos procedimientos puede propiciar que se infraindiquen las reintervenciones en pacientes de edad avanzada, teniendo resultados y complicaciones comparables a las de los sujetos más jóvenes. Por ello, pensamos que, si la citorreducción

tiene como objetivo la mejoría sintomática del paciente, la edad no debiera de ser un factor limitante a la hora de la indicación.

5.19. Análisis específico en gliomas grado III

La catalogación de gliomas anaplásicos carece de vigencia en la actualidad, ya que esta debería hacerse en base al estado de la mutación *IDH* y de la codelección *1p19q*. Sin embargo, debido a la extensión temporal de nuestra serie, carecemos de dicha información en un gran número de casos, por lo que se realiza un análisis del grupo de gliomas grado III de la OMS según la clasificación de 2007 (Louis et al., 2007).

Observamos una gran diferencia en términos de supervivencia entre las cirugías con intención radical y las biopsias, sobre todo con respecto a la OS (79 frente a 9 meses, $p=0.000$). Las diferencias en la mediana de la PPS entre grupos fueron menos significativas (17 frente a 7 meses; $p=0.051$), probablemente debido al escaso número muestral ($n=77$).

Tras aplicar los mismos criterios de exclusión que en los gliomas de grado IV, podemos analizar únicamente 15 sujetos, de los que ($n=8$) fueron tratados con una nueva intervención y ($n=7$) sólo con tratamiento sistémico. El análisis comparativo entre grupos tiene una limitación importante, debido de nuevo al reducido número de sujetos a estudio. Aún así, no se detectan diferencias en las variables estudiadas: edad, sexo, comorbilidades, volumen tumoral, complicaciones y grado de resección tras la primera intervención, estado clínico tras el diagnóstico o en la progresión, cumplimiento del régimen de Stupp o esquemas

quimioterápicos de segunda línea (tabla 37). La única diferencia con significación estadística entre grupos fue el patrón radiológico de progresión, ya que todos los pacientes en los que se indicó la reoperación, y solamente uno de los pertenecientes al grupo de tratamiento sistémico, presentaban recaídas catalogadas como locales sin invasión de zonas elocuentes (test χ^2 ; $p=0.009$).

El escaso número muestral afecta también al análisis comparativo de supervivencia entre los grupos de interés, pudiéndose observar valores de supervivencia claramente superiores en la cohorte de reintervenidos, aunque sin alcanzar significación estadística (OS: 43 meses en reintervenidos frente a 20 meses en grupo control; $p=0.161$ y PPS: 21 meses en reintervenidos frente a 12 meses en grupo control; $p=0.096$).

Aunque parece que la reintervención podría tener más impacto pronóstico en los gliomas de menor grado histológico, el tamaño muestral de nuestra serie es insuficiente para poder realizar dicha afirmación. De hecho, a pesar de que existe mucha literatura acerca de la utilidad de la reintervención en glioblastoma, las publicaciones científicas que evalúan específicamente este tipo de procedimientos en gliomas grado III son muy escasas y pertenecen a la era pre-Stupp (Barker et al., 1996), probablemente por su menor prevalencia.

Un estudio reciente analiza la PPS en un pequeño grupo de pacientes reintervenidos de astocitomas anaplásicos con resultados menores a los obtenidos en nuestra serie (mediana de 13 meses) (Salvati et al., 2019). Consideramos que la creación de nuevos trabajos multicéntricos obedeciendo a la nueva clasificación de la OMS (Louis et al., 2021) es una herramienta indispensable para dirimir esta cuestión. En la creación de modelos pronósticos se debería incluir también el intervalo libre de progresión, factor que en nuestro análisis se

evidencia muy diferente entre grupos, aunque sin significancia estadística, de nuevo influenciado por el escaso tamaño de la muestra (PFS: 26 meses en reintervenciones frente a 13 meses en grupo control; $p=0.183$).

5.20. Limitaciones

Existen una serie de limitaciones en nuestro estudio, que desarrollamos a continuación:

En primer lugar, todos los estudios de naturaleza retrospectiva comparten una serie de condicionamientos. La significación de los resultados finales y la potencia estadística del estudio podrían estar mermadas por la falta de algunos datos en la historia clínica o la estimación indirecta de algunos parámetros, como las escalas de valoración funcional, que en casos puntuales fueron recogidas a partir de cursos clínicos de los informes médicos. Asimismo, la falta de uniformidad en las indicaciones de la reintervención al tener en cuenta una serie de 15 años da lugar a inevitables sesgos de selección. Por motivos éticos, hasta la fecha no se han publicado resultados procedentes de estudios aleatorizados y controlados considerando la reintervención como tratamiento a estudio, probablemente debido a la controversia que existe en la literatura acerca de su impacto en la supervivencia de estos enfermos. Sin embargo, en la actualidad existe un ensayo clínico aleatorizado y controlado fase II en desarrollo, llamado RESURGE. El objetivo principal de este ensayo aleatorizado iniciado en 2015 es el de comparar los resultados de la PPS en 120 pacientes asignados de forma aleatoria a razón 1:1 a los grupos a estudio (reintervención seguida de quimioterapia de

2ª línea frente a quimioterapia de 2ª línea como único tratamiento). Pretende realizar de forma auxiliar un análisis de subgrupos en función del grado de resección (completa / incompleta). Los detalles relativos al ensayo clínico pueden consultarse en <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02394626>.

Adicionalmente, se ha puesto en marcha otro ensayo clínico prospectivo multicéntrico y aleatorizado que pretende testar si una nueva intervención prolonga la OS como mínimo 3 meses desde la inclusión en el estudio (Patel et al., 2022). En él, se implicarán 250 pacientes en los que el cirujano prevé que un segundo procedimiento en la progresión puede aumentar las cifras de supervivencia y la calidad de vida. Los sujetos serán aleatorizados en los grupos a estudio (reintervención y tratamiento estándar versus tratamiento estándar sin reintervención) a razón 1:1 con balance entre cohortes en relación a factores pronósticos, como la edad, el estado funcional y el grado de metilación del promotor del gen *MGMT*. Los detalles del ensayo, que prevé su finalización en 2031 pueden consultarse en <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04838782>.

Por otro lado, a pesar de que se trata de una serie que recoge 15 años de investigación, el hecho de que el presente estudio sea unicéntrico limita también el tamaño de la serie y reduce la potencia estadística de los resultados, en comparación con otros obtenidos de manera multicéntrica (Audureau et al., 2018; Ringel et al., 2016; Suchorska et al., 2016; Zanello et al., 2017). Sin embargo, una ventaja del análisis de una base de datos procedente de una única institución radica en la disminución de los posibles efectos de confusión entre diferentes unidades neuroquirúrgicas y el contraste entre grupos más homogéneos. Además, nuestra evaluación considerando la reintervención como covariable tiempo-dependiente, agregará datos para futuros meta-análisis que empleen este tipo de metodología.

De forma adicional, debemos tener en consideración que las escalas de valoración funcional no examinan todos los matices en relación con la calidad de vida de los pacientes. La tendencia racional actual es la de evaluar el impacto de las terapias médicas no sólo en la supervivencia, sino también en los aspectos referentes a la calidad de vida. En este sentido, el trabajo del grupo de Mukherjee y colaboradores analiza la repercusión de la reintervención en el cuestionario SF-36 (*Short Form 36*) que interroga sobre aspectos en relación con el dolor físico, la vitalidad, la salud mental, el funcionamiento social y la vitalidad, entre otros (Mukherjee et al., 2020). La condición retrospectiva de nuestro análisis impide su evaluación, que juzgamos indispensable en nuevos trabajos que asesoren esta cuestión.

Por último, cabe destacar que los avances en medicina molecular han modificado por completo la clasificación de la OMS de los tumores del SNC (Louis et al., 2021), ya que la determinación del estado mutacional de *IDH* y otros atributos moleculares son indispensables para su categorización. Teniendo en cuenta este nuevo prisma, tumores que exhiben mutación *IDH* deberán considerarse dentro de un mismo grupo, con independencia de sus características histopatológicas. De forma contraria, se puede emitir el diagnóstico de glioblastoma ante un tumor *IDH-wildtype* que presenta alguna de las siguientes anomalías genéticas (mutación del promotor de *TERT*, amplificación de *EGFR* o anomalías cromosómicas 7 /10) con independencia de si presenta proliferación microvascular o áreas de necrosis. Nuestro análisis comienza en 2005, año en el que el estado mutacional de *IDH* no formaba parte de la caracterización molecular rutinaria en gliomas por parte de la mayoría de las instituciones en entre las que nos incluimos; y por ello, el análisis anatomopatológico se basa más en criterios microscópicos que de biología molecular, siguiendo una clasificación precedente (Louis et al., 2007). Aunque ya apreciamos algunos

ejemplos en la literatura (Patel et al., 2022), los futuros trabajos deberán considerar la homogenización del perfil molecular de los casos a estudio siguiendo las nuevas clasificaciones, con el fin de evitar los sesgos que inherentemente se producirán al examinar tumores con distinto comportamiento biológico.

6. CONCLUSIONES

La repercusión de la reintervención en las recidivas de gliomas de alto grado continúa siendo controvertida en la actualidad y motivo de debate en las publicaciones científicas que abordan específicamente este problema.

Considerar a la reintervención como el único factor pronóstico relevante en la supervivencia global o post progresión supone un exceso de simplificación, ya que implica la asunción de que las cohortes a comparar son homogéneas en el resto de sus características. A ello, debe sumarse la reflexión de que es posible que se sobreestimen los beneficios en términos de supervivencia al evaluar la reintervención como variable fija en el tiempo.

A día de hoy, los trabajos que examinan las cirugías de rescate han demostrado un mínimo impacto en la supervivencia de estos enfermos y más estudios con metodología tiempo-dependiente son necesarios para afirmar que realmente este procedimiento pueda suponer un factor de riesgo.

Se antoja indispensable la creación de trabajos de naturaleza multicéntrica, prospectiva y aleatorizada, con grupos que presenten características clínicas e indicaciones quirúrgicas homogéneas; y que obedezcan a los nuevos sistemas de clasificación basados en la biología molecular del tumor, para el correcto análisis del efecto de la reintervención sobre la supervivencia y calidad de vida de los pacientes afectados de recidivas de gliomas de alto grado.

Capítulo II

**ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS DEL ESTADO DE
METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN
MGMT MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN EN
RECIDIVA DE GLIOBLASTOMA**

1. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los recientes avances en neuro-oncología, los gliomas de alto grado siguen estando asociados a mal pronóstico vital. Es posible que la comprensión de los mecanismos que subyacen a las anomalías genéticas presentes en estas lesiones pueda favorecer la creación de nuevos fármacos y dianas terapéuticas que modifiquen la historia natural de la enfermedad, hasta convertirla en un proceso crónico o incluso propiciar su curación. Hasta la fecha, las únicas alteraciones genéticas que han demostrado de forma consistente su relación con la supervivencia son la mutación *IDH* y el estado de metilación del promotor *MGMT*, mientras que otras (amplificación del gen *EGFR*, mutación *TP53*, pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10), los resultados son contradictorios.

Aunque el estado de metilación de *MGMT* se ha postulado como factor pronóstico y de respuesta terapéutica hace más de dos décadas (Esteller et al., 2000), existen una serie de incógnitas acerca de su papel en los gliomas de alto grado que aún a día de hoy siguen siendo motivo de debate en la literatura médica. Entre ellas, destaca el hecho de que se han documentado cambios en el patrón de metilación *MGMT* al comparar dos muestras separadas en el tiempo procedentes del mismo paciente, tras el tratamiento con radio y quimioterapia. Como se destacó en la Introducción, se teorizan diversos mecanismos para explicar este fenómeno entre los que destaca la selección clonal inducida por la temozolamida. Además, es posible que los procesos postulados no sean excluyentes y en su conjunto puedan explicar parte de las diferencias encontradas.

El segundo trabajo de esta tesis doctoral tiene como objetivo estudiar los posibles cambios en el estado de metilación del promotor del gen *MGMT* en una cohorte homogénea de pacientes diagnosticados y tratados por glioblastoma y reintervenidos en la recidiva

nuestro centro, utilizando la pirosecuenciación como técnica de diagnóstico molecular. Esta permite conocer el porcentaje de metilación de cada uno de los dinucleótidos CpG del promotor estudiados. Hipotetizamos que es posible que cambios más sutiles puedan pasar desapercibidos al emplear técnicas de uso más frecuente en las publicaciones científicas, como la MSP y que la metodología basada en pirosecuenciación pueda cuantificarlos. Resulta de especial interés la uniformidad del tratamiento recibido por la cohorte de pacientes reintervenidos, ya que casi la totalidad han completado los seis ciclos de temozolamida que abarca el régimen de Stupp. Por ello se quiere estudiar si existe un decremento porcentual en el estado de metilación de los CpG interrogados en las muestras iterativas del paciente obtenidas en la segunda intervención tras el curso de la radioquimioterapia. Además, se pretende cotejar la magnitud de estos cambios con los datos de supervivencia de los pacientes.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo: La hipótesis que se pretende verificar o refutar es la existencia de un decremento porcentual en el estado de metilación de los CpG interrogados en el promotor del gen *MGMT* mediante la técnica de pirosecuenciación en pacientes reintervenidos de glioblastoma que previamente han recibido tratamiento con radioterapia y temozolamida.

Objetivo General: Estudio de la variabilidad del grado de metilación del promotor del gen *MGMT* mediante pirosecuenciación en muestras pareadas procedentes del mismo paciente antes y después de haber sido tratados con temozolamida.

Objetivos específicos:

1. Estudio de la variación porcentual del grado de metilación del promotor del gen *MGMT* mediante pirosecuenciación en pacientes reintervenidos de glioblastoma.
2. Estudio de los cambios de metilación del promotor del gen *MGMT* mediante pirosecuenciación considerando esta variable como categórica en relación a puntos de corte validados.
3. Estudio comparativo de supervivencia entre los pacientes con diferentes grados de metilación del promotor del gen *MGMT*.
4. Estudio de correlación entre el porcentaje de CpGs metilados y supervivencia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Selección de pacientes y variables a estudio.

Para la selección de casos y el estudio de algunas variables clínicas se empleó la matriz de datos utilizada en el primer trabajo de la tesis, incluyendo los casos disponibles en los años 2020 y 2021. Únicamente los pacientes con confirmación histológica de glioblastoma según los criterios de la última clasificación de la OMS (Louis et al., 2021) que fueron sometidos a más de una intervención entre los años 2005 y 2021 se incluyeron en el análisis. Por ello, los casos de transformación maligna (p.ej. gliomas grado III de la clasificación en la primera intervención que evolucionaron a grado IV en la reintervención), los diagnósticos de radionecrosis en la recidiva sin evidencia de tejido tumoral viable y las lesiones de grado IV que presentaban mutación de *IDH* fueron excluidas del análisis. Las muestras de tejido tumoral incluidas en parafina y fijadas con formol se obtuvieron retrospectivamente del banco de tejidos del Servicio de Anatomía Patológica.

Se recopilaron las siguientes variables clínicas para crear una segunda matriz de datos de menor tamaño:

-Sexo.

-Edad al diagnóstico.

-Tipo de tratamiento tras la primera intervención: Debido a que son pacientes en los que se planteó una segunda intervención, se trata de un subgrupo con mejor pronóstico y cifras de intervalos libres de progresión más largas. Es por ello que

todos los pacientes comenzaron el esquema Stupp y vamos a distinguir únicamente dos situaciones:

- Stupp completo: El paciente realizó radioquimioterapia concomitante y posteriormente recibió los 6 ciclos de temozolamida adyuvante, pudiendo recibir algún tipo de quimioterapia adicional si el centro se encontraba en fase de participación de algún ensayo clínico multicéntrico.
- Stupp incompleto: El paciente realizó la fase concomitante del tratamiento, pero no pudo finalizar los 6 ciclos de adyuvancia con TMZ debido a toxicidades de diferente tipo, progresión de la enfermedad u otras causas.

-Grado de metilación del promotor del gen *MGMT* en la primointervención y en la recidiva: La evaluación por pirosecuenciación se determinó de forma retrospectiva en la primointervención y en la reintervención. En algunos de los casos más nuevos de la serie ya se había realizado esta determinación en alguna de las intervenciones, por lo que en estos casos no fue necesario repetir el análisis. Debido a que la pirosecuenciación es un método de naturaleza cuantitativa, el grado de metilación se expresó como variable categórica, utilizando puntos de corte recientemente validados con valor pronóstico (Gurrieri et al., 2018) y también como variable cuantitativa continua (en porcentajes) con el objetivo de utilizar el análisis estadístico. Los puntos de corte utilizados fueron:

- Promotor hipermetilado: >29% de metilación en los CpGs interrogados.
- Metilación intermedia: Entre 9-29%.

- Promotor no metilado: <9%.

Al igual que en el primer trabajo de esta tesis, los eventos a estudio (variables dependientes) fueron OS, PFS y PPS. Los pacientes que continuaban vivos al fin del periodo de seguimiento (31.12.2021) fueron considerados casos censurados.

-OS: Tiempo expresado en meses entre la fecha de la primera intervención y la fecha de éxitus (determinada en todos los pacientes).

-PFS: Tiempo expresado en meses entre la fecha de la primera intervención y el diagnóstico de progresión mediante neuroimagen (RM) según los criterios RANO (Wen et al., 2010).

-PPS: Tiempo expresado en meses que discurre entre el diagnóstico de progresión y la fecha de éxitus.

3.2. Análisis del grado de metilación del promotor del gen MGMT mediante pirosecuenciación.

3.2.1. Generalidades sobre la pirosecuenciación.

La pirosecuenciación es un método empleado en medicina molecular que permite la detección de una determinada secuencia de ADN gracias a reacciones de luminiscencia. Se trata de un procedimiento de secuenciación por síntesis, en el que la incorporación de un nuevo nucleótido a la cadena de ADN va a producir la liberación de pirofosfatos, moléculas capaces de emitir luz tras una sucesión de reacciones enzimáticas.

Para llevar a cabo la pirosecuenciación, la cadena de ADN es desnaturalizada formándose ADN monocatenario que se hibridará con *primers* específicos. En el tubo de reacción se añadirán además diferentes enzimas (luciferasa, ATP sulfurilasa, ADN polimerasa y apirasa) y sustratos (luciferina y adenosin-5-fosfosulfato). Los nucleótidos serán añadidos a continuación de uno en uno.

Si el nucleótido añadido se corresponde con el que necesita la ADN polimerasa, se incorporará a la cadena en formación y se liberará pirofosfato. El enzima ATP sulfurilasa, en presencia de adenosin-5-fosfosulfato va a transformar el pirofosfato en ATP, que se acoplará a la molécula de luciferina. El complejo ATP-luciferina será el sustrato del enzima luciferasa para producir oxiluciferina, generando una señal luminosa de intensidad proporcional al número de nucleótidos incorporados. La señal lumínica será capturada por sensores específicos y representada de forma gráfica en un pirograma. Finalmente, el enzima apirasa degrada los nucleótidos que no han sido incorporados.

3.2.2. Procedimiento técnico.

Tras seleccionar los bloques de parafina, las muestras para estudio fueron revisadas microscópicamente por el neuropatólogo con el fin de identificar las áreas que contenían un mayor contenido de células neoplásicas. Este paso previo al análisis tiene como objetivo evitar la contaminación por parte de células no tumorales, como ocurre en el caso de áreas de necrosis o infiltrados inflamatorios que son frecuentes en las muestras. El procedimiento cuenta con las siguientes etapas, que se describen de forma resumida a continuación:

1. Extracción del ADN de las muestras.
2. Conversión con bisulfito.
3. Amplificación mediante PCR

4. Inmovilización de los productos mediante reacción con sefarosa.
5. Preparación de los productos como paso previo a la pirosecuenciación.
6. Técnica de la pirosecuenciación.
7. Análisis del pirograma mediante software correspondiente.

1. Extracción de ADN: La extracción de ADN genómico de las muestras

preseleccionadas incluidas en parafina se llevó a cabo mediante un kit de purificación de ADN denominado QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (*QIAGEN, Valencia, CA*). La casa comercial establece una serie de pasos encaminados a extraer la parafina de las muestras, generar la lisis de membranas celulares y prevenir los enlaces cruzados que se producen con formol. Posteriormente, a través del pase por distintos medios, se eliminan los restos de organelas, fibras de colágeno y otros componentes celulares con el objetivo de extraer y recuperar al máximo el ADN genómico.

La cantidad y la calidad del ADN fue cuantificada mediante un espectrofotómetro (Nanodrop). Esta herramienta permite cuantificar la absorbancia (cantidad de luz de una determinada longitud de onda absorbida por una solución) y proporciona diferentes índices que indican la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes. Un valor elevado en estos índices permite desechar la muestra por falta de calidad de la misma.



Imagen 1. Preselección de muestras por parte del neuropatólogo donde se evidencia el marcaje de áreas de mayor tejido tumoral.

2. Conversión con bisulfito: Como se describió en la Introducción, el tratamiento del ADN con bisulfito convierte los residuos de citosina a uracilo, sin afectar a los residuos de 5-metilcitosina. El paso más importante para una correcta determinación del patrón de metilación es la conversión completa de citosinas no metiladas en uracilo, que se consigue exponiendo el ADN a altas concentraciones de bisulfito de sodio, en condiciones de temperatura elevada y pH bajo. Estas duras circunstancias pueden provocar la fragmentación del ADN y posterior pérdida en las fases de purificación (necesarias para eliminar sales de bisulfito y otros agentes químicos que después pueden interferir en la secuenciación). Por ello, este proceso se llevó a cabo con el sistema EpiTect Bisulfite Kit (*QIAGEN, Valencia, CA*), que aporta tecnología específica para proteger el ADN y mantener altas tasas de conversión simultáneamente. El procedimiento comprende una serie de reacciones: la sulfonación, la desaminación hidrolítica y la desulfonación.
3. Amplificación de la región de interés mediante PCR: La amplificación de la secuencia que incluye los 4 sitios CpG a analizar se realizó con el kit comercial *Therascreen MGMT Pyrokit (QIAGEN, Valencia, CA)*. La secuencia a amplificar se encuentra en el exón 1 del gen *MGMT*, situado en el cromosoma 10 desde la posición 131.265.519 hasta 131.265.537 (**YGAYGTTYGTAGGTTTTYG**). Las letras Y representan las probables citosinas metiladas y los conjuntos YG marcados en negrita, los dinucleótidos CpG que se desean estudiar, correspondientes a los sitios CpG 76 a 79 de la isla.

En esta fase, se prepara una mezcla que contiene todos los componentes para la reacción PCR, que incluye *primers* o cebadores directos e inversos (estos últimos marcados con una molécula de biotina denominados biotinilados). A la mezcla de

reacción se va a añadir el ADN previamente convertido con bisulfito a razón de 20µl/5µl en el tubo de reacción PCR para iniciar el proceso de ciclado térmico.

El protocolo programado en el termociclador es el indicado por el fabricante. Comienza con un calentamiento inicial a 95°C para producir la activación de las ADN polimerasas, para posteriormente producir hasta 42 ciclos de 3 pasos a diferentes temperaturas. Cada ciclo consta de tres fases (desnaturalización, alineamiento y extensión).

- Desnaturalización: 20 segundos a 95°C. Gracias a este paso se induce la formación de ADN monocatenario.
- Alineamiento: 30 segundos a 53°C. El descenso de la temperatura favorece la unión del primer a su secuencia complementaria de ADN. Los puentes de hidrógeno, estables entre las cadenas de ADN, sólo se forman cuando la secuencia del primer es muy similar a la secuencia del ADN molde. Posteriormente, la ADN polimerasa unirá el híbrido de la cadena molde y el cebador, y comienza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región que va a ser amplificada.
- Extensión: 20 segundos a 72°C. En esta fase se produce la elongación de la cadena.

Tras realizar la totalidad de los ciclos, se lleva a cabo una fase de elongación final (5 minutos a 72°C), para asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.



Imagen 2. Termociclador utilizado en el laboratorio de anatomía patológica del Hospital Son Espases.

4. Inmovilización de los productos PCR mediante reacción con Streptavidina-Sefarosa:

Tras la amplificación, debe llevarse a cabo una reacción con Streptavidina-Sefarosa para conjugar los amplicones que llevan biotina (biotinilados) y de esta manera, poder capturarlos posteriormente (la molécula de Streptavidina-Sefarosa tiene la capacidad de unir con una alta afinidad a las moléculas de biotina).

Para llevar a cabo dicho procedimiento, se mezclarán en el tubo de reacción PCR los preparados de Streptavidina-Sefarosa y los productos de la PCR a razón de 70 μ l/10 μ l. A continuación, los tubos de reacción se sellarán y se agitarán durante 10 minutos a 1400rpm.

5. Preparación de las muestras previa al análisis por pirosecuenciación: Este paso tiene

como objetivo seleccionar y capturar únicamente las hebras amplificadas y descartar los fragmentos de ADN que no pertenecen a la región de interés. Un cebador específico se unirá a la hebra molde que se quiere estudiar. Para ello, se diluyen los cebadores específicos en una solución tampón sobre una placa de plástico que contiene 24 pocillos.

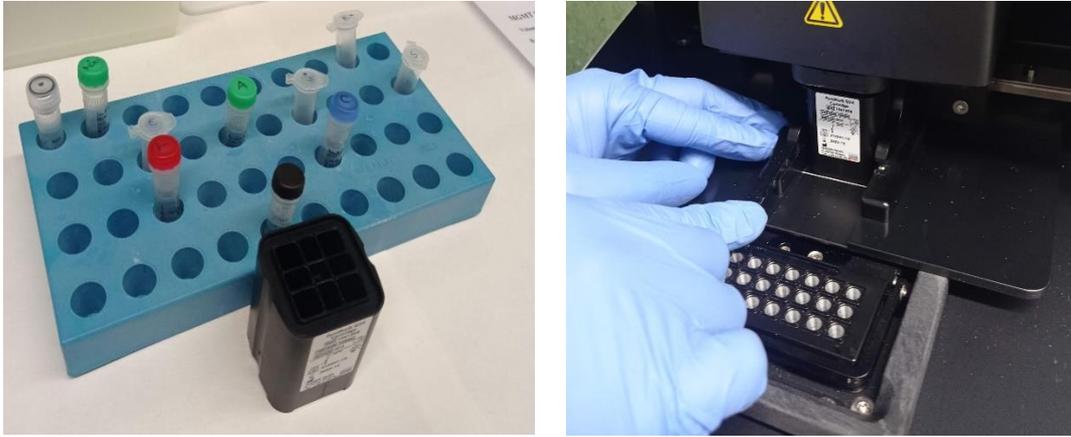
Posteriormente, mediante una herramienta que produce vacío, se aspirarán únicamente las preparaciones que contienen las moléculas de Streptavidina-Sefarosa con las hebras molde inmovilizadas en el paso anterior, y tras una serie de lavados se depositan en la placa con pocillos que será analizada por el *PyroMark Q24* (QIAGEN, Valencia, CA). La preparación de las muestras finaliza con un calentamiento y un enfriamiento posterior.



Imagen 3. Preparación de las muestras previo a la pirosecuenciación. La fotografía muestra la aspiración de las hebras inmovilizadas con sefarosa para posteriormente realizar lavados con el fin de excluir productos no deseados.

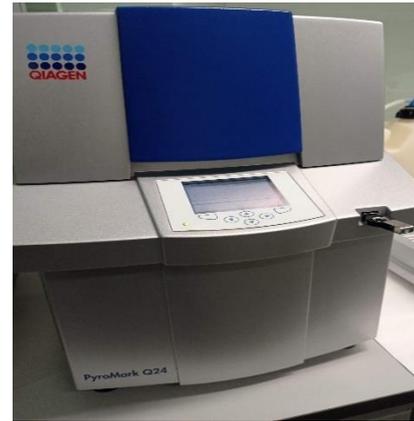
6. Proceso de pirosecuenciación: Las hebras molde están preparadas con su cebador específico para poder llevar a cabo la síntesis de la hebra complementaria. El mecanismo de acción de describió de forma general antes de comenzar con la enumeración de los pasos específicos. Para llevar a cabo la pirosecuenciación, los preparados enzimáticos (que incluyen los enzimas ADN polimerasa, sulfurilasa, luciferasa y apirasa) se disuelven en agua y se mezclan. A continuación, se realiza un llenado de los depósitos de un cartucho específico de la casa comercial, con la mezcla enzimática preparada recientemente, la mezcla sustrato a estudio y

nucleótidos (A,T, C,G) y se siguen las recomendaciones realizadas en el software de *PyroMarkQ24*.



Imágenes 4 y 5. Preparación del cartucho con la mezcla enzimática, sustrato y nucleótidos (izquierda). Colocación del cartucho cargado en el pirosecuenciador (derecha).

El pirosecuenciador comenzará el proceso de reacción enzimática añadiendo los nucleótidos que correspondan para generar la hebra complementaria, proceso que dura aproximadamente 25 minutos. Para asegurar que existe una conversión correcta en la reacción con bisulfito, en la placa de reacción han de existir dos pocillos con muestras preestablecidas que actúan como control, una hipermetilada (proporcionada por la casa comercial) y otra que sólo contiene agua (en la que no se va a producir ninguna reacción). La conversión incompleta con bisulfito puede dar lugar a una cuantificación sesgada del grado de metilación.



Imágenes 6 y 7. Reacciones de fotoluminiscencia captadas por el pirosecuenciador y exhibidas en la pantalla del sistema (izquierda). Pirosecuenciador PyroMark q24 (derecha).

7. Análisis del pirograma: Una vez finalizadas las reacciones de luminiscencia por síntesis, a través de un dispositivo USB se analiza el pirograma en un ordenador del laboratorio. El pirosecuenciador contabiliza el porcentaje de amplicones metilados en cada CpG analizada (4 en total). Después, se realiza una media aritmética por parte del facultativo para obtener el porcentaje final.

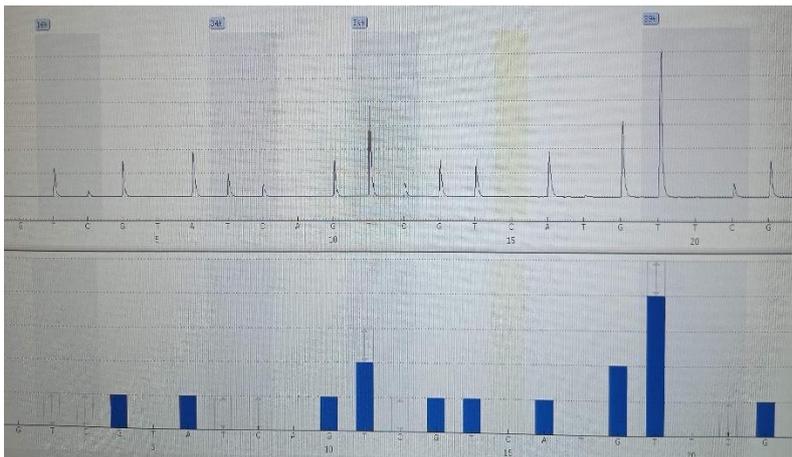


Imagen 8. Resultado de la pirosecuenciación. Se observa que en las 4 CpGs analizadas existe un promedio de 16, 34, 34 y 39% de amplicones metilados respectivamente. Esto produce una media aritmética de 30.75%, por lo que resulta que la muestra es hipermetilada

3.3. Análisis estadístico

El software estadístico utilizado para la evaluación de los resultados fue el SPSS versión 22.0 (IBM, Armonk, NY). Inicialmente se procedió a investigar el patrón de distribución de nuestros datos, mediante la prueba de normalidad de Saphiro-Wilk, ya que el número de casos era inferior a 30. Previo al análisis de las muestras pareadas, se aplicó la prueba de normalidad a la variable diferencia (grado de metilación antes y después de la reintervención).

Debido a nuestros hallazgos, se utilizó la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon para comparar el rango medio de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas debido a la influencia del tratamiento.

Para evaluar la relación entre el grado categórico de metilación (hipermetilado, metilación intermedia, no metilado) y los datos de supervivencia se utilizó el test log-rank obteniendo las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Asimismo, se realizó un segundo análisis de correlación mediante el test de Spearman (no paramétrico), considerando el grado de metilación como variable cuantitativa continua:

- Porcentaje de metilación en la primera intervención con OS y PFS.
- Porcentaje de metilación en la segunda intervención con OS y PPS.

Dicho test proporciona un coeficiente de correlación denominado Rho de Spearman, que puede oscilar entre 1 y -1 y que indica el grado de correlación positiva o negativa entre las variables a estudio. En todos los test, los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos

4. RESULTADOS

4.1. *Criterios de inclusión y exclusión*

Se determinó el status de metilación en 24 de los 36 pacientes de la serie reintervenidos con diagnóstico inicial de glioblastoma. Los motivos de exclusión se relatan a continuación: se documentaron 4 casos de transformación maligna de gliomas anaplásicos en la primointervención, en 5 casos no pudo obtenerse tejido tumoral viable y apto para el análisis de pirosecuenciación, en dos casos se obtuvo el diagnóstico de astrocitoma grado IV con mutación de *IDH*, y el caso restante fue excluido del estudio debido a la obtención de un diagnóstico histológico de radionecrosis.

4.2. *Descripción general del subgrupo*

La mediana de edad en la cohorte de pacientes estudiados fue de 55 años (36-70). Con respecto al sexo, se contabilizan más casos de hombres (13 casos, 54.1%) que de mujeres (11 casos, 45.9%). Todos los pacientes fueron tratados mediante resección microquirúrgica de su lesión, acompañados por diferentes asistentes quirúrgicos incluyendo la neuronavegación, fluorescencia oncológica proporcionada por el 5-ALA y la resonancia magnética intraoperatoria, dependiendo de su disponibilidad en el año en el que se realizó el procedimiento y la preferencia del facultativo.

La resección quirúrgica basada en RM postoperatoria precoz se catalogó como total (GTR) en 22/24 casos (91.6%). Veintiún pacientes (87.5%) completaron la totalidad del

protocolo Stupp tras la primera intervención. En el resto (3 casos, 12.5%); la quimioterapia adyuvante se interrumpió antes del sexto ciclo debido a toxicidades de diferente tipo inducidas por la temozolamida o a recidivas detectadas antes de la finalización de la adyuvancia. Todos los pacientes salvo uno habían fallecido al finalizar el periodo de seguimiento (31.12.2021).

4.3. Resultados de la determinación del grado de metilación del promotor MGMT mediante pirosecuenciación

Con respecto al análisis retrospectivo del estado de metilación del promotor del gen *MGMT* y basándose en los puntos de corte de Gurrieri y colaboradores se obtuvieron los siguientes resultados en relación con las muestras obtenidas de la primera intervención:

- Hipermetilación promotor ($\geq 29\%$): 8 muestras (33.3%)
- Metilación intermedia (9-29%): 10 muestras (41.7%)
- No metilado ($\leq 9\%$): 6 muestras (25.0%)

El análisis subsiguiente de las muestras pareadas reveló que en 15 casos (62.5%) los tumores exhibían un grado de metilación del promotor similar al previo y correspondían a la misma categoría, mientras que en 9 casos (37.5%) ésta se había modificado. Por categorías, se obtienen los siguientes resultados en relación a las muestras procedentes de las reintervenciones:

- Hipermetilación promotor ($\geq 29\%$): 6 muestras (25.0%)
- Metilación intermedia (9-29%): 9 muestras (37.5%)

- No metilado ($\leq 9\%$): 8 muestras (33.5%)

Tal y como se muestra en la tabla 1, se detectaron modificaciones del estado de metilación en el promotor del gen *MGMT* en ambas direcciones, se resaltan los casos en los que se advierte un cambio de categoría hacia superior (3 casos, 12.5%, color amarillo) o hacia inferior (6 casos, 25.0%, color azul).

Pac	Sexo Edad	Rese cc	Metilación Primointerv	R Q	Metilación Reinterv.	PF S	OS	Diferen cia
1	H, 47	GTR	HM (57.5%)	C	HM (59.2%)	25	36	+1.7%
2	H, 66	GTR	HM (30.2%)	C	UM (7.0%)	16	23	-23.2%
3	H, 45	GTR	IM (13.5%)	C	IM (14.5%)	8	17	+1.0%
4	M, 69	GTR	HM (82.2%)	C	HM (92.7%)	47	56	+10.5%
5	H, 60	GTR	IM (12.7%)	C	HM (58.2%)	11	20	+45.5%
6	H, 53	GTR	HM (46.5%)	C	HM (36.7%)	28	97	-9.75%
7	M, 61	GTR	IM (14.0%)	C	IM (21.5%)	12	29	+7.5%
8	M, 66	GTR	IM (22.2%)	C	IM (18.2%)	9	25	-4.0%
9	M, 55	GTR	IM (27.2%)	C	UM (7.5%)	10	16	-19.7%
10	H, 70	GTR	HM (29.7%)	C	UM (8.0%)	20	30	-21.7%
11	M, 62	STR	UM (4.0%)	I	UM (6.2%)	7	13	+2.2%
12	M, 59	GTR	UM (6.2%)	C	UM (5.5%)	13	25	-0.7%
13	M, 56	GTR	IM (20.7%)	C	IM (23.0%)	12	16	+2.2%
14	H, 64	GTR	UM (7.0%)	I	IM (12.7%)	7	12	+5.7%
15	M, 61	GTR	IM (15.2%)	C	IM (14.0%)	9	16	-1.2%
16	H, 48	GTR	UM (4.7%)	C	IM (16.5%)	26	43	+11.7%
17	H, 36	GTR	UM (3.5%)	C	UM (6.0%)	18	26	+2.5%
18	H, 48	GTR	IM (24.5%)	C	UM (4.7%)	9	12	-19.8%
19	M, 47	GTR	IM (11.2%)	C	IM (10.0%)	16	45	-1.2%
20	H, 37	GTR	UM (3.7%)	I	UM (6.0%)	10	19	+2.2%
21	H, 64	STR	HM (74.0%)	C	IM (28.0%)	6	32	-46.0%
22	H, 51	GTR	HM (40.7%)	C	HM (31.2%)	14	18	-9.4%
23	M, 58	GTR	HM (39.7%)	C	HM (29.7%)	103	110	-10%
24	M, 53	GTR	IM (20.0%)	C	UM (8.5%)	24	36	-10.5%

4.4. Resultados del análisis de muestras pareadas

Tabla 1. Características clínicas de la serie. Leyenda: Pac: paciente (N.º), Resecc: resección, GTR: resección total, STR: resección subtotal, HM: promotor hipermetilado ($\geq 29\%$), IM: promotor con Metilación intermedia, UM: promotor no metilado ($\leq 9\%$), por sus siglas en inglés “unmethylated”, RQ: radioquimoterapia, C: Stupp completo, I: Stupp incompleto, PFS: intervalo libre de progresión, OS: supervivencia global.

de metilación en la primera y en la segunda intervención del mismo paciente. Debido al

número de pacientes, se aplicó la prueba de normalidad de Saphiro-Wilk, obteniéndose un valor de p inferior a 0.05, por lo que se concluye que para el correcto estudio estadístico deben utilizarse pruebas no paramétricas.

El valor de la mediana resultante teniendo en cuenta las muestras de la primera intervención fue de 20.35%. Dicho valor disminuye a 14.25% al estudiar las muestras procedentes de las reintervenciones. El test de la suma de rangos de Wilcoxon (no paramétrico) fue empleado para comparar el estado de metilación entre las muestras pareadas de los distintos pacientes, obteniéndose un resultado no significativo ($p=0.346$).

4.5. Análisis de supervivencia con respecto al grado de metilación del promotor de MGMT

Posteriormente se realizó un análisis mediante el test *log-rank* para determinar la relación entre la supervivencia global y el grado de metilación del promotor *MGMT* según las categorías preestablecidas. La mediana de supervivencia global resultó ser de 32, 17 y 19 meses en los distintos grupos. El modelo indica que existe una relación entre el grado de metilación determinado por pirosecuenciación y la supervivencia, estadísticamente significativo (test log-rank, $p=0.05$).

Metilación primointervención	Mediana OS con IC95% (meses)	N.º eventos / N.º casos
Hipermetilado ($\geq 29\%$)	32.0 (23.6 - 40.3)	7/8
Metilación intermedia (9-29%)	17.0 (10.8 - 23.1)	10/10
No metilado ($\leq 9\%$)	19.0 (4.5 – 33.4)	6/6

Tabla 2. Relación entre el grado de metilación determinado en la primera intervención y la supervivencia global (n=24).

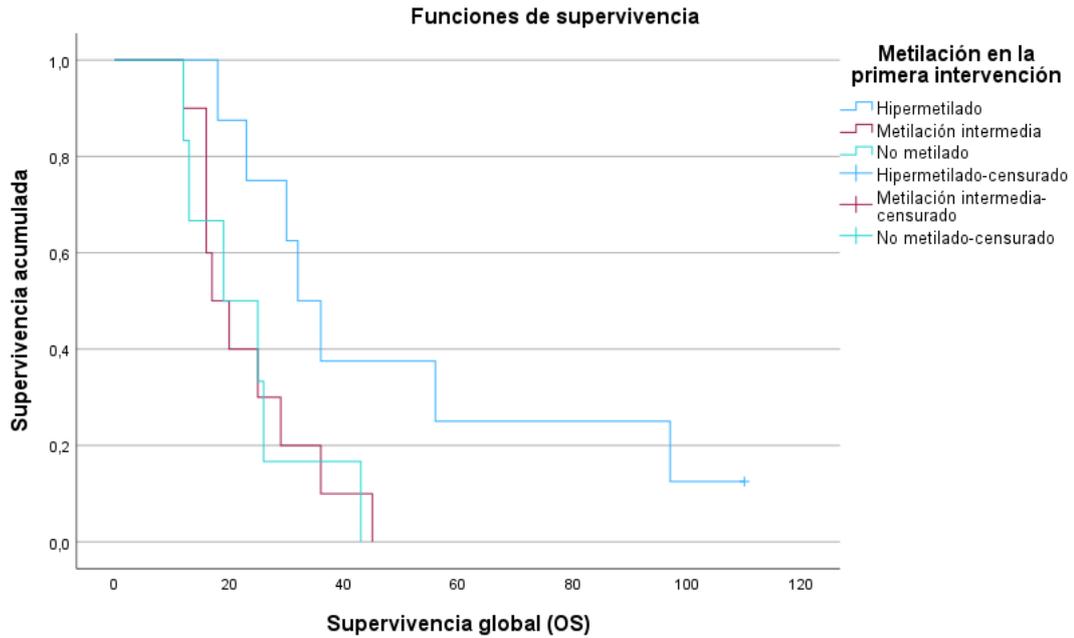


Figura 1. Representación gráfica de las funciones de supervivencia sobre los grupos analizados. Se observa que el grupo de pacientes con tumores hipermetilados (azul) presenta mayores tasas de supervivencia acumulada a lo largo del tiempo respecto a los pacientes con metilación intermedia (rojo) o no metilados (verde). El modelo alcanza significación estadística ($p=0.05$).

De forma similar se investigó la relación entre el grado de metilación del promotor y el intervalo libre de progresión de la enfermedad. Se obtienen medianas de PFS de 20, 10 y 10 meses para los distintos grupos ordenados en orden descendente según el grado de metilación. El modelo vuelve a concluir que esta relación es estadísticamente significativa (test log rank, $p=0.024$).

Metilación primointervención	Mediana PFS con IC95% (meses)	N.º eventos / N.º casos
Hipermetilado ($\geq 29\%$)	20.0 (7.5 – 32.4)	7/8
Metilación intermedia (9-29%)	10.0 (6.9 – 13.0)	10/10
No metilado ($\leq 9\%$)	10.0 (2.7 – 17.2)	6/6

Tabla 3. Relación entre el grado de metilación determinado en la primera intervención y el intervalo libre de progresión (n=24).

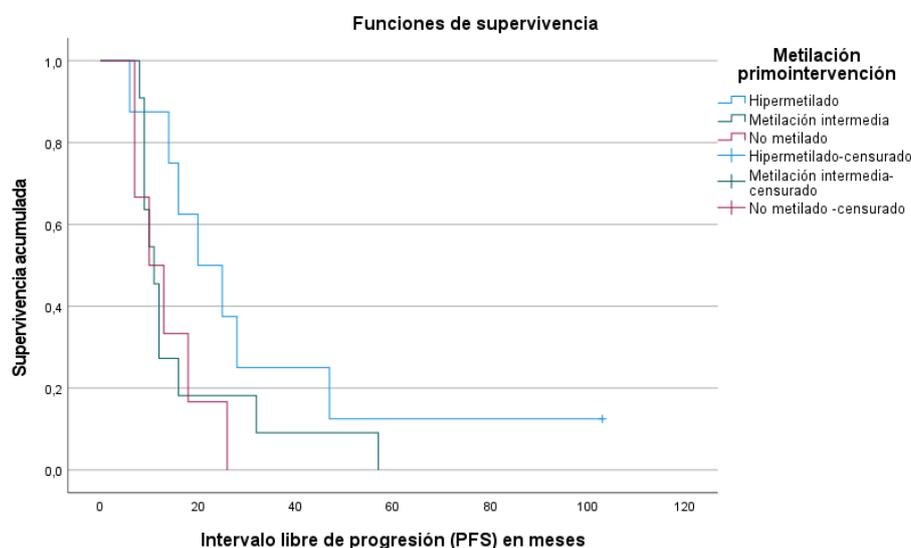


Figura 2. Representación gráfica de las funciones de supervivencia de los distintos grupos a estudio mediante las curvas de Kaplan-Meier. De nuevo, se observa que los pacientes con tumores hipermetilados presentan mayores intervalos libres de progresión. El modelo resulta estadísticamente significativo ($p=0.024$).

Por último, se examina de qué manera el grado de metilación procedente de las muestras de las reintervenciones influye sobre la supervivencia tras la progresión (PPS). En este caso, el modelo no resulta estadísticamente significativo (test log-rank, $p=0.217$). Las muestras de los pacientes que exhibieron un grado intermedio de metilación (9-29%)

presentaron periodos más largos de PPS (mediana de 16 meses) seguido del grupo de pacientes con tumores hipermetilados (9 meses) y, por último, el de no metilados (8 meses).

Metilación reintervención	Mediana PPS con IC95% (meses)	N.º eventos / N.º casos
Hipermetilado ($\geq 29\%$)	9.0 (3.7 – 14.2)	7/8
Metilación intermedia (9-29%)	16.0 (10.4 – 36.4)	10/10
No metilado ($\leq 9\%$)	8.0 (5.0 – 10.9)	6/6

Tabla 4. Relación entre el grado de metilación determinado en la reintervención y la supervivencia tras la progresión (n=24).

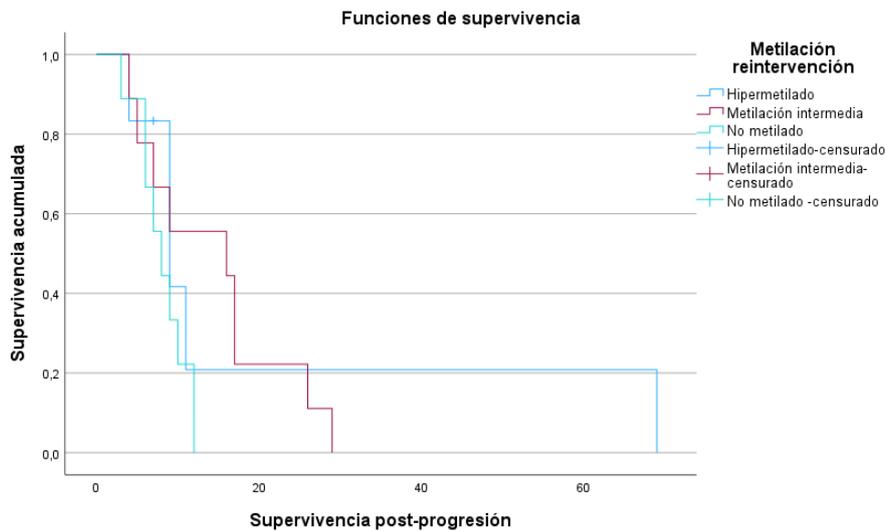


Figura 3. Representación gráfica de las funciones de supervivencia a través de las curvas de Kaplan-Meier, relacionando el grado de metilación determinado en la reintervención y la supervivencia tras la progresión. En este escenario, aunque el grado de metilación intermedio se asocia a mayores índices de supervivencia tras la progresión, el modelo no resulta estadísticamente significativo ($p=0.217$).

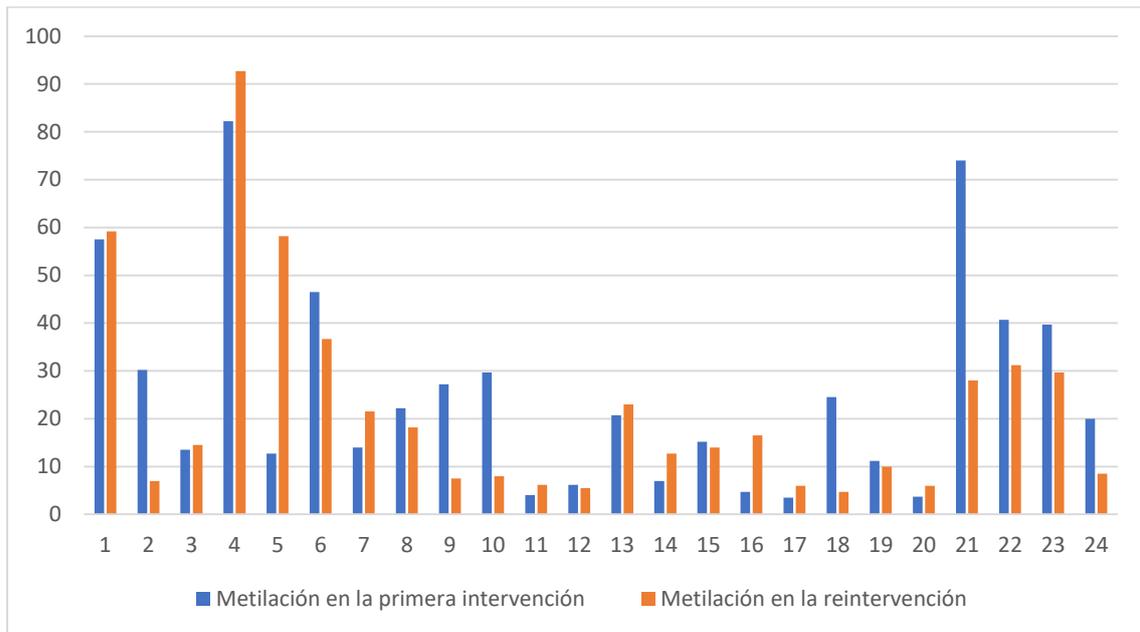


Figura 4. Diagrama de barras que muestra el grado de metilación del promotor en la primera intervención (azul) y en la reintervención (naranja) en todos los pacientes de la serie (n=24).

4.6. Análisis de correlación entre el porcentaje del grado de metilación y las variables de supervivencia.

Aunque el uso de análisis de correlación no supone una práctica estadística habitual en referencia a los análisis de supervivencia en las ciencias médicas, se realizó un estudio adicional para estudiar la relación entre el grado de metilación considerada como variable cuantitativa y el tiempo de las distintas variables de supervivencia. Inicialmente se investigó la distribución de los datos empleando la prueba de normalidad de Saphiro-Wilk. Se analizaron las variables correspondientes al grado porcentual de metilación en la primera y en la segunda intervención, obteniéndose puntuaciones inferiores a 0.05 ($p=0.004$ y $p<0.001$

respectivamente). Por tanto, el test concluye que las variables estudiadas no siguen un patrón de distribución normal y deben emplearse pruebas no paramétricas para su estudio.

El test de correlación de Spearman se utilizó para analizar la relación entre las variables a estudio. En primer lugar, se realiza el análisis incluyendo el porcentaje de metilación en la primera intervención con las variables OS y PFS:

- El porcentaje de metilación determinado en la primointervención está relacionado con la OS. El coeficiente de correlación (Rho de Spearman) fue 0.383 (IC95% 0.026-0.683). El resultado no alcanza significación estadística ($p=0.059$)
- La correlación entre el porcentaje de metilación y el PFS es positivo, pero menor. El coeficiente de correlación (Rho de Spearman) fue de 0.332 (IC95% -0.085-0.650). La significación estadística es menor ($p=0.105$).

Por último, se indaga sobre la relación del porcentaje de amplicones metilados en las reintervenciones y las variables de supervivencia:

- La correlación entre el grado porcentual de metilación en la reintervención y la OS es positiva [coeficiente Rho de Spearman = 0.609, IC95% (0.270-0.814)], siendo estadísticamente significativa ($p=0.001$).
- De manera similar, se encuentra una correlación positiva entre el porcentaje de metilación del promotor *MGMT* y la supervivencia tras la progresión [coeficiente Rho de Spearman = 0.414, IC95% (0.010-0.702)], alcanzando también la significación estadística ($p=0.040$).

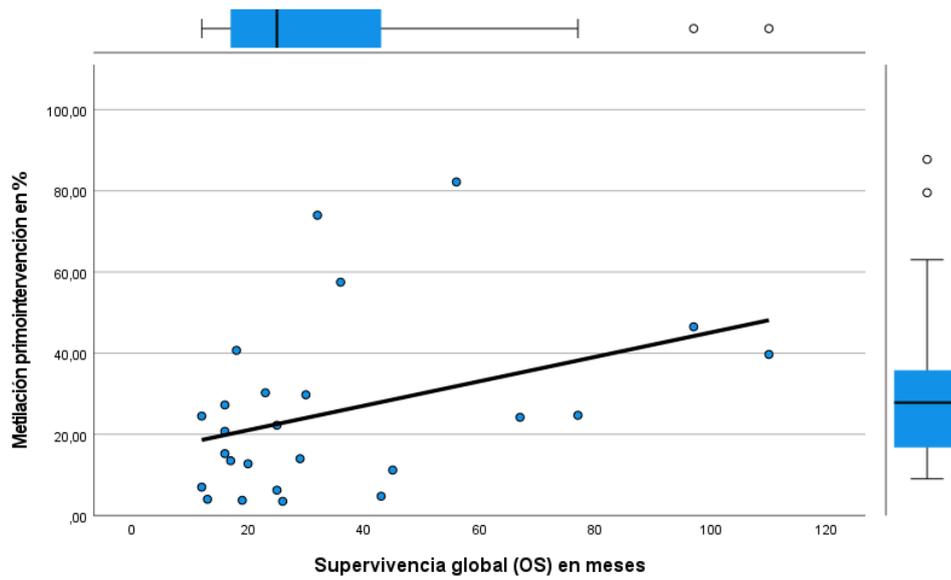


Figura 6. Ejemplo de la representación de un diagrama de dispersión que considera el porcentaje de metilación obtenido en la primera intervención y la OS. Se observa una línea de correlación con pendiente ascendente (valor Rho de Spearman= +0.383).

5. DISCUSIÓN

5.1. La metilación del promotor del gen MGMT: ¿único mecanismo de represión transcripcional?

Aunque nuestro segundo trabajo estudia de forma específica los cambios que se producen en los índices de metilación en el promotor del gen *MGMT* de pacientes que han sido radiados y expuestos a agentes alquilantes, cabe destacar, como idea introductoria general, que este no es el único mecanismo epigenético responsable del total silenciamiento del mismo.

Según la hipótesis de los dos pasos de Knudson, se requiere la pérdida de los dos alelos de un gen para producir su completa inhibición (Knudson, 2001). Así, mutaciones presentes en la línea germinal o adquiridas afectarían a uno de los alelos del gen implicado, constituyendo el primer paso “*first hit*”. Para que se produzca la pérdida completa de la función del gen sería necesario que se produjese otro paso “*second hit*”, que generalmente implicaría la pérdida del material cromosómico que contiene la otra copia del gen. Dicho fenómeno es conocido en genética como pérdida de heterocigosidad.

En el caso que nos ocupa, la hipermetilación del promotor del gen podría constituir el primer paso de la hipótesis, existiendo teóricamente la posibilidad de una metilación monoalélica que lleve a la coexistencia de promotores metilados y expresión de proteína detectados por los métodos de laboratorio (Ueda et al., 2004). Según la teoría de Knudson, para que se origine una inactivación funcional completa del gen *MGMT* sería necesaria la

hipermetilación simultánea y aberrante de ambos alelos, o bien la hipermetilación de uno y la pérdida de heterocigosidad del otro (Soejima et al., 2005).

Por otro lado, el fenómeno de hipermetilación per se no es suficiente para inhibir la transcripción del gen. Además, son necesarios mecanismos epigenéticos adicionales que implican modificaciones en las histonas y adhesión de algunas proteínas reguladoras a los residuos metilados para que se produzca la interrupción transcripcional. Estos procesos darán lugar a un cambio conformacional en la cromatina, produciéndose heterocromatina, que imposibilitará la unión del ADN a los factores de transcripción, silenciando el gen (Herman & Baylin, 2003; Soejima et al., 2005). Estos mecanismos podrían explicar los resultados obtenidos en estudios *in vitro*, en los que se evidencia un silenciamiento del gen sin la existencia de promotores hipermetilados, al incidir directamente sobre estos procesos (Ma et al., 2008).

Además, es posible que cambios epigenéticos que afectan al cuerpo del gen y no únicamente al promotor sean asimismo relevantes en la expresión del enzima MGMT. Un estudio comparó células de melanoma resistentes al antineoplásico fotemustina frente a sus líneas parentales, encontrando diferencias en la expresión de MGMT (mucho mayor en las resistentes). Al estudiar los patrones de metilación, sólo se observaron diferencias significativas en el cuerpo del gen y no el promotor, sugiriendo que, aunque la metilación a nivel del promotor parece relacionarse de forma inversa con la expresión de proteína, los cambios epigenéticos producidos en otras zonas del gen podrían hacerlo de forma directa (Christmann et al., 2001). Por ello, la ausencia de expresión de MGMT no debería atribuirse de forma exclusiva a la hipermetilación del promotor de su gen, ya que el grado de metilación de zonas adyacentes puede asimismo influir en ella (Bhakat & Mitra, 2003).

Por último, otro aspecto a considerar es el nivel de metilación del promotor, dado que este fenómeno podría influir de modo gradual. Las técnicas cuantitativas o semicuantitativas nos proporcionan información acerca del porcentaje aproximado de CpGs metilados en el promotor y el segundo capítulo de esta tesis intenta esclarecer si el grado de metilación se relaciona con la supervivencia de los pacientes a estudio, asumiendo la teoría de que está implicada una disminución en la expresión de la proteína. Sin embargo, nuestro trabajo no analiza la relación entre el grado porcentual de metilación y la expresión de proteína MGMT; no obstante, esta hipótesis ha sido propuesta por diversos grupos de investigación y corroborada en algunas publicaciones. El grupo de Ogino analiza cuantitativamente mediante la técnica MethyLight el grado de metilación de promotores de distintos genes entre los que se encuentra *MGMT* en una serie de 272 pacientes afectados de cáncer colorrectal. Sus resultados evidencian una estrecha correlación entre el grado de metilación y la expresión de proteína mediante determinación inmunohistoquímica (Ogino et al., 2006). De forma similar, Nagasaka y colaboradores demuestran que el grado de metilación de dos regiones específicas del promotor *MGMT* determinado mediante COBRA está relacionado con la disminución o ausencia completa de expresión de enzima MGMT en una serie de pacientes con cáncer colorrectal (Nagasaka et al., 2008). Por último, Shaw y colaboradores utilizan la pirosecuenciación como método de detección cuantitativa para investigar el grado de metilación de promotores de diversos genes asociados con el desarrollo de carcinoma escamoso de cuello (incluyendo *MGMT*) y su relación con la expresión de ARNm. Sus resultados evidencian una estrecha correlación a la inversa entre ambas mediciones (Shaw et al., 2008). Con estos datos, podemos hipotetizar que las metilaciones monoalélicas o parciales no conlleven necesariamente un silenciamiento genético y que el grado de metilación pueda influir de modo más o menos acentuado en la quimiorresistencia tumoral.

5.2. Mecanismos de regulación adicionales de la expresión de *MGMT*

Además de la hipermetilación de los dinucleótidos contenidos en la isla CpG del promotor, se han descrito otros posibles mecanismos reguladores de la expresión del enzima *MGMT*. Diversos estudios apuntan a que no existe una gran congruencia entre el estado de metilación del promotor y los niveles de *MGMT* determinados por inmunohistoquímica (Brandner et al., 2021; Brell et al., 2005; Wang et al., 2017). Dichos hallazgos hacen teorizar que la metilación del promotor no siempre refleja la expresión genética y que el mecanismo por el cual la hipermetilación del promotor *MGMT* produce una mejor respuesta a la terapia con alquilantes no se conoce con exactitud. Algunos de los mecanismos reguladores se comentan brevemente a continuación:

- *TP53*: Este gen, localizado en *17p13*, codifica la proteína p53, implicada en multitud de procesos entre los que se incluye el control del ciclo celular. Factores genotóxicos (radioterapia, quimioterapia) o no genotóxicos (isquemia) sobre el ADN propician la activación de *TP53* y la acumulación de p53 en el núcleo celular. Dicho fenómeno conduce a la activación transcripcional de los genes diana de p53, que, en general, son responsables del detenimiento del ciclo celular o el inicio de procesos apoptóticos (Reinhardt & Schumacher, 2012).

p53 parece influir en la expresión de *MGMT* independientemente del estado de metilación del promotor (Rodríguez et al., 2008). La sobreexpresión de p53 parece inhibir los procesos transcripcionales de *MGMT* en cultivos celulares, mediante un posible mecanismo de unión directa a la región promotora (Blough et al., 2007).

Sin embargo, cabe recordar que la mutación de *TP53* es una de las anomalías genéticas más frecuentes en glioblastomas y especialmente en gliomas de estirpe astrocitaria de menor grado histológico, por lo que quizás este mecanismo de regulación podría no resultar muy relevante. No obstante, algunos autores han sugerido el planteamiento de terapias génicas con transferencia del gen *TP53* en combinación con agentes alquilantes. De este modo, se produciría una depleción de enzima que mejoraría la quimiosensibilidad (Srivenugopal et al., 2001).

- Pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10 (*LOH10; loss of heterozygosity 10*):

Como se comentó en la Introducción, la pérdida de material genético del cromosoma 10 es una anomalía presente en una gran parte de glioblastomas y astrocitomas anaplásicos (Yoshimoto et al., 2002). La región que con mayor frecuencia parece deleccionarse se sitúa en el brazo largo del cromosoma 10 y está comprendida entre *10q24* y *10q26*, región donde precisamente hallamos el gen *MGMT* (*10q26*). Esta ubicación implicaría que en aquellos tumores que exhiben una pérdida de heterocigosidad de *10q*, podría existir una insuficiencia del gen *MGMT*, suponiendo cambios en la expresión y actividad de la proteína, incluso en ausencia de metilación del alelo restante no deleccionado.

Además, debemos tener en cuenta que esta delección implica la pérdida de múltiples loci entre los que pueden encontrarse otros genes supresores de tumores, influyendo sobre el comportamiento biológico del tumor (Maxwell et al., 2006).

- Sitios de unión para “AP-1”, elementos sensibles a corticoides y otros factores de transcripción: El promotor del gen *MGMT* contiene varios sitios de unión para el factor de transcripción AP-1 (*Activator Protein-1*) y otros elementos sensibles a corticoesteroides (Pegg, 2000). AP-1 regula la expresión genética en respuesta a diversos estímulos como

estrés, citocinas, factores de crecimiento o infecciones. Por otro lado, la existencia de elementos sensibles a corticoides implicaría que, en presencia de estos, podría producirse un incremento en la expresión del enzima y en la quimiorresistencia tumoral.

Algunos estudios en líneas celulares han de mostrado que la exposición a dexametasona supone un incremento de los niveles de ARNm MGMT y proteína MGMT (Ueda et al., 2004) Por ello, algunos autores sostienen que el tratamiento prolongado con corticoesteroides supondría un aumento de la expresión de MGMT, conllevando a un peor pronóstico por aumento de la quimiorresistencia a temozolamida (Parkinson et al., 2008).

No obstante, aunque el tratamiento con corticoides ha demostrado ser factor independiente de mal pronóstico en algunas series (Michaelsen et al., 2013a; van Linde et al., 2017), este mecanismo específico debería ser demostrado *in vivo* con nuevos estudios para emitir conclusiones sólidas al respecto.

Asimismo, diversos factores de transcripción se han postulado como potenciadores de la actividad del promotor de *MGMT*. Entre ellos destacan la proteína SP-1, el factor nuclear kappa B y otros tantos que pueden ser revisados en el artículo de Wick y colaboradores (Wick et al., 2014).

- Modificaciones en las histonas: Se ha demostrado que el incremento del grado de metilación de la histona 3 lisina 9 (H3K9) se relaciona con una regulación a la baja del grado de transcripción del gen, mientras que la acetilación de la H3K9 y la disminución de la metilación de ese residuo se han asociado con una regulación transcripcional al alza de *MGMT* y resistencia a la TMZ en líneas celulares de glioblastoma. En consonancia con estos hallazgos, se observó que el tratamiento con inhibidores de la acetilasa específica de histonas inducía una resistencia adquirida a la TMZ (Kitange et al., 2012).

- Fenómenos post-transcripcionales: Existe evidencia procedente de estudios *in vitro* sobre cómo procesos post-transcripcionales de fosforilación pueden inducir una disminución de la expresión de MGMT o su inactivación, modificando de ese modo la actividad reparadora del ADN de la propia célula (Srivenugopal et al., 2000). Las circunstancias y el grado en el que el enzima MGMT se regula mediante este mecanismo no está claramente definido.

Además, también es conocida una regulación a nivel post-transcripcional, mediada por distintas especies de microARN específicos que se unen directamente a los productos de transcripción de *MGMT*, produciendo en algunos casos inestabilidad del ARNm o disminución de la translación a proteína MGMT (Kreth et al., 2013).

- Exposición a agentes genotóxicos: Ya conocemos que la exposición a genotóxicos como los agentes alquilantes o la radioterapia pueden propiciar un cambio en el patrón de metilación del promotor del gen. No obstante, otros autores han intentado demostrar cambios en el perfil de expresión del enzima al analizar muestras pareadas de pacientes sometidos a reintervenciones. El estudio de Capper y colaboradores analiza 19 muestras pareadas de glioblastoma con diferentes variaciones en la expresión (Capper et al., 2008). Aunque el mecanismo no se conoce con exactitud, se postula que la terapia con alquilantes podría desencadenar un aumento de la actividad antiapoptótica celular y que el aumento de la expresión y actividad de MGMT podría formar parte de este. Se ha sugerido que el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB) es capaz de inducir la expresión de ARNm y enzima MGMT al unirse directamente al promotor del gen, independientemente de su estado de metilación (Lavon et al., 2007).

- Exposición a agentes no genotóxicos: Existe evidencia científica de que la hipoxia tisular puede aumentar la expresión de MGMT mediante la señalización mediada por el factor inducible por la hipoxia (HIF-1 α), que podría contribuir en la resistencia a la TMZ por parte de células madre tumorales localizadas en nichos hipóxicos cercanos a tejido necrótico (Pistollato et al., 2010).

Todos estos posibles mecanismos biológicos adicionales no son estudiados por las técnicas de laboratorio empleadas en la práctica clínica habitual y podrían ser responsables, en parte, de la relación entre la expresión y actividad de MGMT, la supervivencia y la sensibilidad a alquilantes sin tener en cuenta el grado de metilación del promotor del gen. No obstante, no conocemos el peso individual de cada uno de estos mecanismos reguladores en la respuesta a la terapia con alquilantes, y, además, en nuestro trabajo no se realizan test de laboratorio que determinen la presencia o actividad del enzima MGMT.

5.3. Análisis de los cambios del grado de metilación del promotor del gen MGMT en pacientes reintervenidos de glioblastoma

Una revisión reciente de la literatura que analiza este fenómeno recoge los datos de 476 pacientes sometidos a cirugía de rescate en recurrencias de glioblastoma pertenecientes a 16 estudios diferentes (Feldheim et al., 2019). Su análisis determina la producción de un cambio en el patrón de metilación en 115/476 casos (24.0%), siendo más frecuente el cambio de hipermetilado a no metilado (71 casos) que viceversa (44 casos). Esta observación estaría en concordancia con nuestra hipótesis inicial, en la que presuponemos que el tratamiento con

agentes alquilantes produce una selección de las células tumorales con promotores que presentan menores índices de metilación, y, por tanto, más resistentes a la quimioterapia.

En nuestro estudio observamos que, tras la reintervención, se produce un cambio de grupo en 9/24 pacientes (37.5%). Debemos tener en cuenta que en la revisión de Feldheim y colaboradores, 12 de 16 trabajos basan sus resultados en la MSP que sólo otorgan la distinción entre “metilado” o “no metilado” y los estudios que emplean la pirosecuenciación también dicotomizan a los pacientes con referencia a un punto de corte (Hudson et al., 2018; O’Regan et al., 2018). Nuestro trabajo, basado en puntos de corte recientemente validados (Gurrieri et al., 2018) considera además la categoría de “metilación intermedia”, por lo que es posible que exista una sensibilidad aumentada con respecto al fenómeno de cambio.

Sin embargo, constatamos que los cambios se producen en ambas direcciones. En 6 casos (25.0%) se evidenció una modificación desde patrones hipermetilados o metilación intermedia hacia no metilados, mientras que en otros 3 pacientes (12.5%) ocurrió la situación inversa. Dichas observaciones no son congruentes con nuestra hipótesis inicial, ya que observamos incrementos importantes del grado de metilación en pacientes que han estado expuestos a 6 ciclos de temozolamida adyuvante.

Si analizamos el grado de metilación como una variable cuantitativa continua, también observamos que se producen incrementos como decrementos con frecuencia similar. En 11 casos (45.9%) se constató un aumento del grado de metilación con respecto a la muestra de la primointervención y en 13 casos (54.1%) una disminución. Al estudiar los casos en función de la intensidad de la variación, parece que es más frecuente que se produzcan pequeños incrementos o decrementos ($> 10\%$), aunque en algunos pacientes se registran variaciones importantes (hasta -46% y $+45.5\%$, como límites). Si se considera la mediana global, este valor disminuye aproximadamente un 6% entre la primointervención y

la reintervención (de 20.35% a 14.25%). Podríamos concluir que, en nuestra serie, el hecho de afinar el análisis al considerar la metilación como variable cuantitativa continua, no pone de manifiesto ningún patrón de cambio que pudiera no detectarse al tratarla como variable categórica.

5.4. Grado de metilación, supervivencia y sensibilidad a alquilantes

En comparación con trabajos previos, nuestra pequeña serie presenta mayores cifras de OS y PFS (Montemurro et al., 2016; Stupp et al., 2005), así como una proporción mayor de tumores que presentan altos grados de metilación del promotor (Gurrieri et al., 2018). En este último estudio, que comparte nuestros valores umbrales, el 47.0% de los pacientes presenta tumores no metilados, mientras que en nuestra cohorte este dato es del 25.0% (6 de 24 casos). Estas diferencias pueden traducir que las indicaciones para una nueva intervención en nuestro grupo son altamente selectivas. Los pacientes con mal estado funcional o con PFS inferiores a 6 meses no se consideran candidatos, por lo general. Por ello, nuestra serie podría estar afectada por un sesgo de selección, ya que estaríamos excluyendo a pacientes portadores de lesiones más agresivas (por ejemplo, con índices de metilación del promotor *MGMT* más bajos), que general tienen intervalos libres de progresión menores o peor estado clínico y no llegan a considerarse nunca para cirugías de rescate.

La relación entre el grado de metilación y la supervivencia global se hace manifiesta en nuestra serie, al igual que ocurre en la mayoría de trabajos publicados en la literatura (Hegi et al., 2004). En una cohorte bastante homogénea en términos de tratamiento, el grado

de metilación se relaciona con la supervivencia global, tanto si se considera como variable categórica (OS de 32, 17 y 19 meses en las categorías hipermetilado, metilación intermedia y no metilado respectivamente; $p=0.05$) o variable cuantitativa continua (Rho Spearman = 0.383, $p=0.059$). Los resultados alcanzan significación estadística y están en consonancia con estudios previos que manejan series de mayor tamaño, pero utilizan la técnica MSP. A modo de ejemplo, el grupo de Brandes también calculó una OS de 32 meses en tumores metilados y de 20 meses en no metilados (Brandes et al., 2017).

La relación observada entre el grado de metilación en la reintervención y la PPS es más discutida en la literatura. Autores como Felsberg y colaboradores han establecido la conexión entre tumores metilación positiva en la reintervención y mayor supervivencia tras la progresión (Felsberg et al., 2011), mientras que otros, como el grupo italiano de Brandes no ha encontrado dicha asociación; los valores de metilación en la primera o segunda cirugía se relacionan con la OS, pero no con la PPS. En nuestra serie, la asociación entre la determinación del status de metilación en la reintervención y la PPS fue inesperada. Los tumores que exhibían un grado intermedio de metilación estaban más asociados con la PPS que los hipermetilados, sin alcanzar esta vez significación estadística en el test *log-rank* ($p=0.217$). Esta tendencia podría ser explicada por el número limitado de pacientes incluidos en la serie, aunque pueden teorizarse otros mecanismos. Una posible explicación es que la presencia de promotores hipermetilados y una probable menor expresión de *MGMT*, propicie la acumulación de otras lesiones en el ADN que podrían conferir un peor pronóstico en comparación con el grupo de lesiones catalogadas como “metilación intermedia”. Como ejemplo, se ha demostrado que la inactivación epigenética del gen *MGMT* puede facilitar la aparición de mutaciones en *TP53* y otros genes implicados en el proceso de tumorigénesis o

en la progresión de la enfermedad (Tomicic et al., 2021; Wick et al., 2014). Igualmente, las lesiones que presentan un índice de metilación inferior al 9% siguen teniendo peor pronóstico (PPS de 9, 16 y 8 meses en hipermetilados, metilación intermedia y no metilados respectivamente).

La correlación entre el grado de metilación y la sensibilidad a los agentes alquilantes puede inferirse de los datos obtenidos del PFS. El intervalo libre de progresión de los pacientes con tumores que exhiben hipermetilación del promotor del gen *MGMT* supone el doble que el de los otros (20, 10 y 10 meses en los grupos respectivamente), siendo estadísticamente significativo ($p=0.024$).

5.5. Aspectos metodológicos referentes a los métodos de detección

Es posible que el valor del grado de metilación obtenido sea en cierta medida dependiente del tipo de test de laboratorio empleado. En la actualidad, no existe un consenso sobre qué determinación nos proporciona la información más relacionada con el pronóstico de los pacientes y la respuesta a temozolamida. El estudio comparativo de Wang y colaboradores analizó mediante pirosecuenciación, MSP cuantitativa e inmunohistoquímica la metilación del promotor del gen y la expresión de proteína en 350 muestras de gliomas y gangliogliomas, utilizando la PSQ como técnica de referencia. Sus resultados revelan una alta concordancia entre las dos técnicas que analizan la metilación del promotor (superior al 90%); sin embargo, la situación no se reproduce al comparar los niveles de proteína *MGMT* con cualquiera de los dos métodos anteriores (Wang et al., 2017).

Hasta la fecha, la técnica MSP ha sido la más utilizada en el estudio de los cambios producidos en la metilación del promotor de *MGMT* (Barresi et al., 2021; Brandes et al., 2010; Christmann et al., 2010; Hamilton et al., 2011; Jung et al., 2010; Suzuki et al., 2011) debido a su sencillez y bajo coste. Basándose en la premisa del que los resultados puedan estar condicionados por los diferentes métodos de análisis molecular, Park y colaboradores estudian los cambios epigenéticos en el promotor del gen *MGMT* y en otros genes de reparación (MMR) en muestras pareadas de glioblastoma mediante diferentes técnicas de laboratorio. En el análisis clásico de MSP, únicamente se detectó el cambio en dos pacientes de la serie (8.0%), en ambas direcciones; sin embargo, en el examen mediante la técnica MS-MLPA se evidenció un porcentaje de cambio del 75%, generalmente hacia un menor grado de metilación en recurrencias (C.-K. Park et al., 2012). El trabajo de Park es uno de los principales motivadores del segundo capítulo de esta tesis, ya que observa grandes diferencias en los resultados entre métodos cualitativos y cuantitativos y evidencia una tendencia a la baja en el grado de metilación en muestras procedentes de reintervenciones, que con otra técnica hubieran sido indetectables. En nuestro estudio, sin embargo, la utilización de la pirosecuenciación como método cuantitativo no ha evidenciado esta propensión.

La positividad de la metilación del promotor del gen *MGMT* mediante pirosecuenciación se correlaciona con mejorías en la OS y el PFS, tal y como indica un meta-análisis reciente que recoge un total de 11 series (Zhao et al., 2016). Sus resultados indican, que, independientemente del punto de corte utilizado (rango: 8-10%), las muestras consideradas positivas tienen relación con un menor riesgo de fallecer y con intervalos libres de progresión más largos, por lo que puede considerarse una herramienta diagnóstica válida.

Hemos revisado específicamente los artículos en los que se emplea la pirosecuenciación para el análisis de los cambios de metilación en muestras pareadas de glioblastoma.

El trabajo del grupo de Felsberg es interesante porque estudia muestras pareadas de glioblastoma empleando tanto la MSP como la pirosecuenciación. Sus resultados indican que ambos métodos son comparables, ya que se observa una tasa de cambio de aproximadamente el 11% con ambas técnicas, utilizando un punto de corte del 8% en el caso de la pirosecuenciación para distinguir los estados “metilado y “no metilado” (Felsberg et al., 2011).

O'Regan y colaboradores publican conclusiones superponibles a las nuestras al estudiar muestras pareadas de glioblastoma comparando la primointervención y la recurrencia mediante pirosecuenciación. Sus resultados evidencian una tasa de cambio del 36%, empleando el 9% como punto de corte, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas y con modificaciones en ambas direcciones. Este artículo analiza también, mediante la misma técnica de laboratorio, el cambio en el grado de metilación de las secuencias LINE1 (*Long Interspersed Nucleotide Element 1*), que podría definirse como un marcador de metilación global del genoma. Se observa una tasa de cambio del 45%, pero en este caso se obtienen resultados con significación estadística, ya que todas las muestras procedentes de la reintervención exhiben grados menores de metilación al compararlas con sus homólogas. Su análisis de supervivencia indica que la metilación del promotor MGMT no es un factor determinante, pero la de LINE1 sí lo es, ya que los casos en los que se detecta una disminución en la metilación global se observa un riesgo de mortalidad casi cuatro veces mayor. Los autores también concluyen que los cambios de metilación de genes específicos

como el *MGMT* parecen no depender de los cambios en la metilación global (O'Regan et al., 2018).

El grupo de Hudson y colaboradores manejan una serie de 19 pacientes en los que estudian un amplio panel genético en muestras pareadas de glioblastoma. Su estudio incluye la determinación de la metilación del promotor *MGMT* mediante pirosecuenciación con un valor de corte del 13%. Se observa un cambio en únicamente dos casos (10.5%), ambos hacia “no metilado” (Hudson et al., 2018).

Los test de laboratorio presentan una serie de limitaciones. Con respecto a los métodos cuantitativos, la dificultad radica en definir un punto de corte clínicamente relevante para estratificar a los pacientes. Hemos observado, en el caso específico de la pirosecuenciación, la utilización de diversos valores: 8, 9, 10 o 13%. Generalmente, estas cifras límite se establecen a partir de los valores inferiores de distribuciones de datos obtenidas de un gran número de resultados del test. Las distribuciones pueden solaparse y el comportamiento de las lesiones con valores cercanos al punto de corte no es claro, influenciado además por la posibilidad de que existan patrones de metilación heterogéneos en la misma lesión y la contaminación por parte de células no tumorales. Por ello, la metodología empleada en este estudio introduce el término de metilación intermedia, en la que se agrupan los tumores que no pueden asignarse inequívocamente a los grupos “metilado” o “no metilado” y formando así una “zona gris”. Este concepto es aceptable en ensayos clínicos, pero no debería ser utilizado a la hora de determinar decisiones terapéuticas individuales. Una estrategia posible para estos casos “dudosos” podría incluir la realización de otro método distinto, como la MSP, con el objetivo de catalogar ese caso como “metilado” o “no metilado”. Aunque este abordaje no proporcionará un resultado inequívoco en todos los

casos, es posible que disminuya el porcentaje de pacientes sin un resultado definitivo. En nuestro artículo, utilizamos los puntos de corte analizados por el estudio de Gurrieri y colaboradores, en la se establecen 9 y 29% como cifras de corte entre grupos. Esta estratificación en tres grupos en una cohorte de más de cien pacientes resulta en una OS de 13.2, 15.8 y 19.5 meses ($p=0.0002$) y un PFS de 7.9, 11.6 y 15.0 meses ($p=0.004$) (Gurrieri et al., 2018). Sin embargo, en nuestro caso no observamos tantas diferencias entre los grupos de “metilación intermedia” y “no metilado” en la OS (17 y 19 meses) y en el PFS (10 y 10 meses). Dichas diferencias podrían explicarse por un sesgo de selección, ya que en la publicación de referencia analizan una serie de pacientes consecutivos y no seleccionados, mientras que nuestro trabajo constituye una selección de pacientes reintervenidos.

Por otro lado, los diversos métodos de laboratorio disponibles en el mercado analizan diferentes sitios CpG dentro de la isla. Sin embargo, sigue sin estar definido cuántos o que CpGs específicos deben estar metilados para causar un silenciamiento transcripcional o correlacionarse con la respuesta al tratamiento o el pronóstico vital. Por ello, no conocemos el valor clínico y pronóstico del hecho de que muestras estudiadas por métodos diferentes sean catalogadas como iguales a pesar de que son diferentes CpGs los que se analizan (Wick et al., 2014). Esta cuestión es abordada por una revisión sistemática Cochrane que analiza diversos trabajos en los que se analiza un tipo de técnica o se realizan comparaciones entre métodos. Sus resultados indican que los estudios de metilación del promotor son mejores predictores diagnósticos que los niveles de proteína medidos por inmunohistoquímica. Por otro lado, se postula que la pirosecuenciación puede ser mejor predictora de la supervivencia que la MSP, aunque sin respaldo estadístico significativo. En cuanto al proceso de las muestras, sitios

CpGs analizados o puntos de corte empleados, la revisión no arroja datos conclusivos (Brandner et al., 2021).

Con el objetivo de subyugar estas discrepancias, debería existir una tendencia hacia un test estandarizado en todos los pacientes. Esta situación ideal implicaría el uso de la misma técnica tanto para ensayos clínicos como en la práctica clínica habitual. Dicho test, debería ser sensible y específico, de fácil reproducibilidad y aplicable en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina. En la actualidad, la clasificación actual de la OMS no tiene en cuenta el estado de metilación de *MGMT* para la calificación molecular de gliomas y existen opiniones discrepantes acerca de si este dato debería ser incluido en la próxima clasificación por su relevancia clínica. En el caso de ser añadido, el análisis molecular debería ser fácil de realizar, sin un equipamiento excesivamente especializado o costoso, para poder llevarse a cabo en la mayoría de los laboratorios. Con estos requisitos, se argumentaría el uso de MSP como técnica de elección. Además, sería de interés el refinamiento de guías terapéuticas en gliomas de alto grado teniendo en cuenta una estratificación de los pacientes con respecto a los datos moleculares de su lesión.

5.6. Aspectos metodológicos referentes a la calidad de las muestras a estudio

Otra causa posible para las diferencias encontradas radica en la calidad de las muestras. Para evitar resultados sesgados debidos a contaminación por tejido necrótico o inflamatorio, las muestras tumorales fueron cuidadosamente marcadas bajo microscópico óptico por parte de los neuropatólogos de nuestro centro con el fin de seleccionar la mayor

cantidad de células neoplásicas. Posteriormente, los técnicos de Anatomía Patológica proceden con una disección mediante bisturí y realizan cortes de 2 μm en el micrótopo para después continuar con la extracción de ADN. Este tipo de metodología ya está descrita en otros trabajos (Barresi et al., 2018), proporcionando una relación de más del 80% entre células tumorales y contaminantes. Aunque nuestro trabajo tiene en cuenta este aspecto, no hemos proporcionado una cuantificación numérica aproximada de la calidad de las muestras a estudio, aunque parece poco probable que existan demasiadas alteraciones debidas a este fenómeno.

Además, es meritorio destacar la importancia de las medidas de control de calidad internas y externas a la hora de realizar los test, ya que, decisiones terapéuticas basadas en el contexto de falsos positivos o negativos podrían ser perjudiciales para los pacientes. Además de las buenas prácticas por parte del personal técnico de laboratorio las medidas de control deberían incluir controles de calidad en los test diagnósticos, implementación de medidas para evitar y detectar contaminación o guías para la interpretación de los datos o solución de problemas. En nuestro caso, se adoptaron las medidas necesarias incluyendo un control de la reacción de conversión con bisulfito en todas las muestras.

5.7. Heterogeneidad intratumoral

La heterogeneidad intratumoral con respecto al silenciamiento epigenético del promotor del gen *MGMT* es otras de las posibles causas que pueden explicar los hallazgos discrepantes y ha sido descrita en varias publicaciones. Un grupo italiano estudió mediante

MSP la metilación del promotor en la parte central y periférica del tumor en 24 pacientes con glioblastoma, 11 de los cuales se reintervinieron realizándose un estudio pareado adicional. Su serie incluye un porcentaje relativamente alto de glioblastomas *IDH-1* mutado (5 casos, 20.0%), ya que algunos suponen transformaciones malignas de gliomas de menor grado histológico. El análisis determina que 19 de los 24 casos (80.0%) son homogéneos con respecto al estado de metilación, y en los 5 casos restantes se repite siempre el mismo patrón: los tumores son metilados en la parte central y no metilados en la periferia. De las 11 recidivas estudiadas, se documenta un cambio en 3 de ellas (27.0%), siendo todos los tumores de presentación heterogénea en la primointervención. Podría especularse que un tumor presenta diferentes líneas celulares que exhiben determinados patrones de metilación y que, tras la exposición a diferentes factores, la recidiva está producida por la expansión clonal de una de esas líneas (los tumores en la recidiva fueron siempre homogéneos). El tratamiento con TMZ debería favorecer la eliminación de la línea celular hipermetilada, sin embargo, los resultados son controvertidos ya que, en dos de los casos, la recidiva presenta el promotor metilado (Barresi et al., 2018).

Della Puppa y colaboradores propusieron el estudio de la metilación del promotor *MGMT* mediante MSP y la expresión de la proteína *MGMT* mediante inmunohistoquímica en tumores de 12 pacientes extrayendo muestras de tres zonas concéntricas, postulando que existe un gradiente hipóxico intratumoral (el *core*, generalmente quístico o necrótico más hipóxico y la periferia, más vascularizada). Parece que la expresión de la proteína se relaciona con el área de adquisición de la biopsia (mayor expresión en la zona isquémica central), mientras que la metilación del promotor no. Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Pistollato y colaboradores, quienes postulan al factor inducible por la hipoxia

(HIF-1 α) como mediador del aumento de la expresión del enzima MGMT en zonas hipóxicas (Pistollato et al., 2010). Se observó un análisis discordante entre capas que evidencia heterogeneidad en 4 de los 12 tumores estudiados (25.0%), aunque debe tenerse en cuenta la posible afectación de los resultados debido al extenso grado de necrosis de las muestras procedentes de la parte central de tumor. Los resultados son discordantes con los expresados en el estudio anterior, ya que existen muestras metiladas y no metiladas con independencia de si el área estudiada era la central o la periférica (Della Puppa et al., 2012). Existe además una discreta correlación entre la metilación del promotor y la expresión de proteína, hecho ya destacado por otros trabajos (Brell et al., 2005). Estos datos vuelven a apoyar que en la expresión de la proteína MGMT existen otros mecanismos implicados, aparte del silenciamiento epigenético.

Otros estudios han evidenciado una homogeneidad en la metilación del promotor *MGMT* al estudiar muestras histológicas de diferentes partes del mismo tumor. El grupo de Grasbon-Frodl estudió la metilación del promotor y la expresión de la proteína en muestras procedentes de varias biopsias estereotácticas en la misma lesión mediante MSP e inmunohistoquímica respectivamente. De los 25 pacientes y 69 especímenes analizados, únicamente se detectaron diferencias entre las muestras en un caso. La expresión de la proteína MGMT también resultó ser igual o altamente similar. Sin embargo, tampoco encuentran una gran correlación entre metilación de promotor y expresión de proteína (Grasbon-Frodl et al., 2008).

El hallazgo de Hamilton y colaboradores es curioso. El artículo revela que la determinación del status de metilación de *MGMT* podría variar en función de la técnica de fijación empleada para la conservación de las muestras. Su estudio comporta el análisis de muestras fijadas por congelación o por inclusión en parafina de 13 pacientes afectados de

glioblastoma a los que realizan biopsias de distintas áreas del tumor (zona periférica captante de contraste, zona adyacente a la captación de contraste y zona central necrótica) para estudiar, mediante MSP, el estado de metilación del promotor del gen *MGMT*. Se observaron discrepancias en algunas de las muestras procedentes del mismo paciente (4 de 13) en función de si habían sido fijadas por congelación o incluidas en parafina, aunque se no se evidenciaron cambios en las diferentes biopsias de la misma lesión al aplicar la misma técnica molecular. La explicación a estos hallazgos es desconocida, aunque los autores postulan que el tiempo que discurre desde la toma de biopsia hasta la fijación, o el proceso de fijación en sí podría alterar el estado de metilación (Hamilton et al., 2011).

Aunque la heterogeneidad intratumoral se postula como una de las posibles razones que explican la discrepancia entre los resultados obtenidos, sólo algunos de los trabajos que analizan específicamente esta cuestión encuentran diferencias en un bajo porcentaje de casos. En nuestro caso y debido al análisis retrospectivo de las muestras, no podemos saber con exactitud el área tumoral de la que proceden, aunque es posible que se trate de la zona captante de contraste, ya que es donde se encuentra la mayor parte del tejido tumoral viable. Además, debido a las limitaciones económicas y al elevado coste del análisis mediante pirosecuenciación, sólo fue posible la evaluación de una muestra procedente de cada procedimiento quirúrgico.

5.8. Selección clonal por agentes alquilantes

Debido a su mecanismo de acción, la selección clonal inducida por el tratamiento con temozolamida se propone como el mecanismo principal por el que se explica el remodelado del patrón de metilación del promotor del gen *MGMT* y la quimiorresistencia que eventualmente se producen durante el curso clínico de la enfermedad. Los resultados de estudios *in vitro* proporcionados por Beier y colaboradores demuestran que la concentración de TMZ alcanzada en pacientes únicamente es suficiente para eliminar las células sin expresión de *MGMT*, pero no las células *MGMT*-positivas (Beier et al., 2008). Bajo esta premisa, el tratamiento con TMZ produciría una presión citotóxica selectiva, eliminando las líneas celulares que presenten una expresión baja de la proteína *MGMT* (con promotores *MGMT* hipermetilados) e induciendo por sí misma una quimiorresistencia posterior al seleccionar clones con bajos niveles de metilación del promotor y alta expresión de proteína, mucho más resistentes a la terapia alquilante (Brandes et al., 2010).

Esta teoría ha sido corroborada por varios autores en distintas publicaciones. El grupo japonés de Suzuki fue uno de los primeros en demostrar mediante MSP la tendencia hacia un mayor número de tumores no metilados en recurrencias de gliomas de distinto grado histológico tratados con temozolamida (10 de un total de 13). Además, evidencian un aumento de los niveles de ARNm de *MGMT* en recurrencias, que se correlaciona con la ausencia de promotores metilados (Suzuki et al., 2011).

Mediante la misma técnica, el grupo de Christmann analiza los cambios de metilación en recurrencias de glioblastoma en pacientes tratados con TMZ. Además, determinan de forma paralela la actividad de *MGMT* medida por actividad radiactiva. Encuentran una gran

proporción de cambio en las muestras pareadas, en las que casi todas las recurrencias son no metiladas, que se acompaña de un aumento de la actividad MGMT (Christmann et al., 2010).

Jung y colaboradores ofrecen otro punto de vista al realizar su análisis en 18 muestras pareadas únicamente en glioblastomas tratados con diferentes regímenes de quimioterapia. Todos recibieron temozolamida, y en algunos casos, nimustina combinada con cisplatino de forma adicional. Su estudio radica en determinar el grado de metilación del promotor mediante MSP y la expresión de proteína mediante inmunohistoquímica. Señalan un cambio en el patrón de metilación en 5 de 18 especímenes (27%), casi todos hacia promotores no metilados; mientras que la expresión de proteína presentaba una tasa de cambio mucho más elevada, presentando un 83% de las muestras un aumento en los niveles de MGMT al compararlas con las precedentes (Jung et al., 2010). Con estos resultados podríamos hipotetizar que existen mecanismos inducidos por el tratamiento implicados en el aumento de expresión de MGMT, produciendo quimiorresistencia, sin alterar el patrón de metilación del promotor en un gran número de casos.

El fenómeno de quimiorresistencia tumoral adquirida debida a factores epigenéticos se ha postulado como un mecanismo general que puede aplicarse a diferentes tipos de cáncer (Brown et al., 2014) y en el caso específico de MGMT y temozolamida; se ha intentado explicar mediante un modelo matemático estocástico (Storey et al., 2019). En el trabajo de Storey y colaboradores se reseña que la reducción observada en muchos trabajos en el grado de metilación en las muestras procedentes de reintervenciones no puede explicarse por una selección clonal evolutiva, sugiriendo que la TMZ juega un papel activo en esta alteración epigenética.

Debido a que la TMZ es un agente alquilante y actúa transfiriendo grupos alquilo/metilo en las posiciones N⁷ u O⁶ de los residuos de guanina, el mecanismo preciso por el cual este fármaco contribuye a la desmetilación del promotor *MGMT* no está claro. Varias vías de señalización han sido teorizadas en diferentes publicaciones. En el artículo de Boldogh y colaboradores, se demuestra que agentes alquilantes similares a la TMZ, activadores de la proteína-kinasa C, producen un aumento en los niveles de ARNm *MGMT* (Boldogh et al., 1998). Años más tarde, el grupo de Lavoie descubre que algunas isoformas de la proteína-kinasa C pueden producir una inactivación de metiltransferasas (DNMT1) mediante un proceso de fosforilación, contrarrestando la metilación (Lavoie et al., 2011). Estos resultados concuerdan con los del grupo de Ichimura, que demuestra que la fosforilación de DNMT1 se asocia a la presencia de promotores hipometilados (Ichimura et al., 2009).

Estos estudios nos brindan cierta evidencia experimental sugiriendo que la TMZ podría contribuir en una regulación a la baja del grado de metilación del promotor *MGMT*, mediante la activación de vías de señalización celular dependientes de la proteína-kinasa C y la fosforilación de DNMT1.

Storey y colaboradores (Storey et al., 2019) también plantean la posibilidad de que la TMZ pueda afectar a la función de las enzimas TET (*Ten Eleven Translocation*), conocidas por disminuir la actividad de metiltransferasas por medio de mecanismos de oxidación (Ji et al., 2014).

Por otro lado, un grupo polaco ha publicado un trabajo reciente en el que se estudian los cambios que se producen en el ADN con respecto al residuo 5-metilcitosina en líneas celulares de glioma expuestas a TMZ. Aunque 5-mC no es un producto de reacción

producido por la TMZ, los autores analizan los cambios a nivel global en el ADN en esta marca epigenética principal. Los autores encuentran que, a largo plazo, en las líneas celulares tratadas con TMZ, se observa un fenómeno de hipometilación global, probablemente causado por estrés oxidativo, que podría ocasionar la expresión incontrolada de genes causantes de quimiorresistencia (Barciszewska et al., 2015).

Sin embargo, el hecho de que tras la exposición a TMZ se produce un decremento en el nivel de metilación, sigue siendo controvertido al evidenciarse en diferentes estudios incluyendo el nuestro, cambios en la dirección opuesta a la esperable (de no metilado a hipermetilado) en muestras pareadas de pacientes que fueron tratados con temozolamida (Barresi et al., 2018; Brandes et al., 2010; Brandes et al., 2017; O'Regan et al., 2018; Park et al., 2012; Parkinson et al., 2007). Consideramos que nuestra serie muestra un carácter bastante homogéneo en términos de tratamiento complementario tras la primera intervención. Todos los pacientes fueron tratados con radioterapia y TMZ concomitante y en 21 casos (84.0%) se completaron los 6 ciclos de adyuvancia con TMZ.

Además, cabe destacar que algunos autores han encontrado discrepancias en los patrones de metilación en recidivas de glioblastoma dependiendo de si los pacientes fueron tratados con radioterapia seguida de TMZ frente a quimiorradioterapia concomitante (Brandes et al., 2010; Jung et al., 2010). Otros, sin embargo, destacan la pérdida de metilación en recurrencias de gliomas de bajo grado en pacientes que no han sido tratados con alquilantes (Christmann et al., 2010).

Todos estos datos sugieren, en su conjunto, que la dinámica de los cambios epigenéticos que afectan al promotor del gen *MGMT* a lo largo del curso clínico de la

enfermedad, puede ser muy compleja, no estar afectada únicamente por la selección clonal debida a alquilantes y no ser comprendida en su totalidad en el momento actual. Por otro lado, es posible que la TMZ pudiese generar quimiorresistencia por otras vías biológicas distintas a la metilación del promotor de *MGMT*. Según el estudio de Deeheger y colaboradores, la exposición de modelos xenógrafos derivados de pacientes afectados de glioblastoma a TMZ aumentó el número de células madre precursoras de glioma (GSC, *glioma stem cells*). Los autores argumentan que la TMZ produciría una reprogramación desde un estado de célula de glioblastoma diferenciada a uno de célula madre indiferenciada, mediada por factores inducibles por la hipoxia, postulando un nuevo mecanismo de quimiorresistencia (Deeheger et al., 2014).

5.9. Limitaciones

El presente análisis muestra una serie de limitaciones evidente, que desarrollamos a continuación:

Al tratarse de un estudio retrospectivo, existen carencias en su diseño. Aunque existió una preselección y un control de calidad del ADN en todas las muestras, desconocemos el área tumoral de la que proceden, por lo que podrían existir sesgos inherentes a este hecho.

Por otro lado, debido al elevado coste, únicamente se analizó una muestra por paciente, asumiendo que existe una gran homogeneidad con respecto al patrón de metilación de las áreas de los tumores estudiados.

Por último, cabe destacar el pequeño tamaño muestral de la serie debido a las selectivas indicaciones de reintervención en nuestro centro. Además de limitar el poder estadístico de nuestras conclusiones, es posible la generación de sesgos de selección.

6. CONCLUSIONES

El valor pronóstico del estado de metilación del promotor del gen *MGMT* determinado mediante técnicas de pirosecuenciación sobre la supervivencia global, el intervalo libre de progresión y la sensibilidad a temozolamida es manifiesto, a pesar del pequeño tamaño muestral de la serie.

Sin embargo, la relación entre la determinación de este aspecto epigenético en la recidiva y la supervivencia post-progresión no es tan concluyente, por lo que es posible que repetir el análisis molecular no tenga tanta relevancia en estos casos, al no modificar las decisiones terapéuticas.

A pesar de la homogeneidad de la serie en términos de diagnóstico anatomopatológico, excluyéndose previamente los astrocitomas grado IV con mutación de IDH y de tratamiento complementario con temozolamida; el estudio cuantitativo de muestras pareadas analizando el grado de metilación del promotor del gen *MGMT* evidenció tanto incrementos como decrementos. Estos datos sugieren que la selección clonal inducida por agentes alquilantes no es el único factor influyente sobre la compleja dinámica que modula los cambios epigenéticos en el promotor del gen.

Otros factores, como la heterogeneidad intratumoral en términos de metilación del promotor, calidad de las muestras y test de laboratorio empleado han podido influir de igual modo en los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abedi, A. A., Grunnet, K., Christensen, I. J., Michaelsen, S. R., Muhic, A., Møller, S., Hasselbalch, B., Poulsen, H. S., & Urup, T. (2021). A Prognostic Model for Glioblastoma Patients Treated With Standard Therapy Based on a Prospective Cohort of Consecutive Non-Selected Patients From a Single Institution. *Front Onc, 11*, 174.
2. Alkhaibary, A., Alassiri, A. H., AlSufiani, F., & Alharbi, M. A. (2019). Ki-67 labeling index in glioblastoma; does it really matter? *Hemat Oncol Stem Cell Ther, 12*(2), 82–88.
3. Ammirati, M., Galicich, J. H., Arbit, E., & Liao, Y. (1987). Reoperation in the treatment of recurrent intracranial malignant gliomas. *Neurosurg, 21*(5), 607–614.
4. Arvold, N. D., Shi, D. D., Aizer, A. A., Norden, A. D., Reardon, D. A., Lee, E. Q., Nayak, L., Dunn, I. F., Golby, A. J., Johnson, M. D., Claus, E. B., Chiocca, E. A., Ligon, K. L., Wen, P. Y., & Alexander, B. M. (2017). Salvage re-irradiation for recurrent high-grade glioma and comparison to bevacizumab alone. *J Neurooncol, 135*(3), 581–591.
5. Audureau, E., Chivet, A., Ursu, R., Corns, R., Metellus, P., Noel, G., Zouaoui, S., Guyotat, J., le Reste, P. J., Faillot, T., Litre, F., Desse, N., Petit, A., Emery, E., Lechapt-Zalcman, E., Peltier, J., Duntze, J., Dezamis, E., Voirin, J., ... Pallud, J. (2018). Prognostic factors for survival in adult patients with recurrent glioblastoma: a decision-tree-based model. *J Neurooncol, 136*(3), 565–576.
6. Azoulay, M., Santos, F., Shenouda, G., Petrecca, K., Oweida, A., Guiot, M. C., Owen, S., Panet-Raymond, V., Souhami, L., & Abdulkarim, B. S. (2017).

- Benefit of re-operation and salvage therapies for recurrent glioblastoma multiforme: results from a single institution. *J Neurooncol*, 132(3), 419–426.
7. Balana, C., Vaz, M. A., Sepúlveda, J. M., Mesia, C., del Barco, S., Pineda, E., Muñoz-Langa, J., Estival, A., de Las Peñas, R., Fuster, J., Gironés, R., Navarro, L. M., Gil-Gil, M., Alonso, M., Herrero, A., Peralta, S., Olier, C., Perez-Segura, P., Covela, M., ... Carrato, C. (2020). A phase II randomized, multicenter, open-label trial of continuing adjuvant temozolomide beyond 6 cycles in patients with glioblastoma (GEINO 14-01). *Neurooncol*, 22(12), 1851–1861.
 8. Barbagallo, G. M. v., Jenkinson, M. D., & Brodbelt, A. R. (2008). ‘Recurrent’ glioblastoma multiforme, when should we reoperate? *Br J Neurosurg*, 22(3), 452–455.
 9. Barciszewska, A. M., Gurda, D., Głodowicz, P., Nowak, S., & Naskręć-Barciszewska, M. Z. (2015). A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells. *PloS One*, 10(8).
 10. Barker, F. C., Chang, S. M., Gutin, P. H., Malec, M. K., McDermott, M. W., Prados, M. D., & Wilson, C. B. (1998). Survival and functional status after resection of recurrent glioblastoma multiforme. *Neurosurg*, 42(4), 709–723.
 11. Barresi, Caffo, M., Luca, G. de, & Giuffrè, G. (2021). O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation can change in glioblastoma recurrence due to intratumor heterogeneity. *Glioma*, 1(6), 208-213.
 12. Bates, S. E. (2020). Epigenetic Therapies for Cancer. *N Eng J Med*, 383(7), 650–663.
 13. Becker, K., Dosch, J., Gregel, C. M., Martin, B. A., & Kaina, B. (1996). Targeted expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase

- (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 56(14), 3244–3249.
14. Beier, D., Röhrli, S., Pillai, D. R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L. A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., Giebel, B., Wischhusen, J., Reifenberger, G., Hau, P., & Beier, C. P. (2008). Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res*, 68(14), 5706–5715.
 15. Bergman, D., Modh, A., Schultz, L., Snyder, J., Mikkelsen, T., Shah, M., Ryu, S., Siddiqui, M. S., & Walbert, T. (2020). Randomized prospective trial of fractionated stereotactic radiosurgery with chemotherapy versus chemotherapy alone for bevacizumab-resistant high-grade glioma. *J Neurooncol*, 148(2), 353–361.
 16. Beyersmann, J., Gastmeier, P., Wolkewitz, M., & Schumacher, M. (2008). An easy mathematical proof showed that time-dependent bias inevitably leads to biased effect estimation. *J Clin Epidemiol*, 61(12), 1216–1221.
 17. Bhakat, K. K., & Mitra, S. (2003). CpG methylation-dependent repression of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration. *Carcinogenesis*, 24(8), 1337–1345.
 18. Bloch, O., Han, S. J., Cha, S., Sun, M. Z., Aghi, M. K., McDermott, M. W., Berger, M. S., & Parsa, A. T. (2012). Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival. *J Neurosurg*, 117(6), 1032–1038.
 19. Blough, M. D., Zlatescu, M. C., & Cairncross, J. G. (2007). O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells. *Cancer Res*, 67(2), 580–584.

20. Blumenthal, D. T., Mendel, L., & Bokstein, F. (2016). The optimal regimen of bevacizumab for recurrent glioblastoma: does dose matter? *J Neurooncol*, *127*(3), 493–502.
21. Bobola, M. S., Blank, A., Berger, M. S., & Silber, J. R. (2007). O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase deficiency in developing brain: implications for brain tumorigenesis. *DNA Repair*, *6*(8), 1127–1133.
22. Bolard, P., Quantin, C., Esteve, J., Faivre, J., & Abrahamowicz, M. (2001). Modelling time-dependent hazard ratios in relative survival: application to colon cancer. *J Clin Epidemiol*, *54*(10), 986–996.
23. Boldogh, I., Ramana, C. V., Chen, Z., Biswas, T., Hazra, T. K., Grösch, S., Grombacher, T., Mitra, S., & Kaina, B. (1998). Regulation of expression of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling. *Cancer Res*, *58*(17), 3950–3956.
24. Brandes, A. A., Franceschi, E., Paccapelo, A., Tallini, G., Biase, D. de, Ghimenton, C., Danieli, D., Zunarelli, E., Lanza, G., Silini, E. M., Sturiale, C., Volpin, L., Servadei, F., Talacchi, A., Fioravanti, A., Foschini, M. P., Bartolini, S., Pession, A., & Ermani, M. (2017). Role of MGMT Methylation Status at Time of Diagnosis and Recurrence for Patients with Glioblastoma: Clinical Implications. *Oncologist*, *22*(4), 432-437.
25. Brandes, A. A., Franceschi, E., Tosoni, A., Bartolini, S., Bacci, A., Agati, R., Ghimenton, C., Turazzi, S., Talacchi, A., Skrap, M., Marucci, G., Volpin, L., Morandi, L., Pizzolitto, S., Gardiman, M., Andreoli, A., Calbucci, F., & Ermani, M. (2010). O⁶-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can

- change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Neurooncol*, *12*(3), 283–288.
26. Brandes, A. A., Tosoni, A., Franceschi, E., Sotti, G., Frezza, G., Amistà, P., Morandi, L., Spagnoli, F., & Ermani, M. (2009). Recurrence pattern after temozolomide concomitant with and adjuvant to radiotherapy in newly diagnosed patients with glioblastoma: correlation With MGMT promoter methylation status. *J Clin Oncol*, *27*(8), 1275–1279.
27. Brandner, S., McAleenan, A., Kelly, C., Spiga, F., Cheng, H. Y., Dawson, S., Schmidt, L., Faulkner, C. L., Wragg, C., Jefferies, S., Higgins, J. P. T., & Kurian, K. M. (2021). MGMT promoter methylation testing to predict overall survival in people with glioblastoma treated with temozolomide: a comprehensive meta-analysis based on a Cochrane Systematic Review. *Neurooncol*, *23*(9), 1457–1469.
28. Brandsma, D., Stalpers, L., Taal, W., Sminia, P., & van den Bent, M. J. (2008). Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas. *Lancet Oncol*, *9*(5), 453–461.
29. Brell, M., Tortosa, A., Verger, E., Gil, J. M., Viñolas, N., Villá, S., Acebes, J. J., Caral, L., Pujol, T., Ferrer, I., Ribalta, T., & Graus, F. (2005). Prognostic significance of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res*, *11*(14), 5167–5174.
30. Broekx, S., Weyns, F., & de Vleeschouwer, S. (2020). 5-Aminolevulinic acid for recurrent malignant gliomas: A systematic review. *Clin Neurol Neurosurg*, *195*:105913.

31. Brown, R., Curry, E., Magnani, L., Wilhelm-Benartzi, C. S., & Borley, J. (2014). Poised epigenetic states and acquired drug resistance in cancer. *Nat Rev Cancer, 14*(11), 747–753.
32. Brown, T. J., Brennan, M. C., Li, M., Church, E. W., Brandmeir, N. J., Rakszawski, K. L., Patel, A. S., Rizk, E. B., Suki, D., Sawaya, R., & Glantz, M. (2016). Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol, 2*(11), 1460–1469.
33. Bugni, J. M., Han, J., Tsai, M. sheue, Hunter, D. J., & Samson, L. D. (2007). Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. *DNA Rep, 6*(8), 1116–1126.
34. Cabrera, A. R., Kirkpatrick, J. P., Fiveash, J. B., Shih, H. A., Koay, E. J., Lutz, S., Petit, J., Chao, S. T., Brown, P. D., Vogelbaum, M., Reardon, D. A., Chakravarti, A., Wen, P. Y., & Chang, E. (2016). Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Pract Radiat Oncol, 6*(4), 217–225.
35. Cairncross, J. G., Ueki, K., Zlatescu, M. C., Lisle, D. K., Finkelstein, D. M., Hammond, R. R., Silver, J. S., Stark, P. C., Macdonald, D. R., Ino, Y., Ramsay, D. A., & Louis, D. N. (1998). Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst, 90*(19), 1473–1479.
36. Cankovic, M., Mikkelsen, T., Rosenblum, M. L., & Zarbo, R. J. (2007). A simplified laboratory validated assay for MGMT promoter hypermethylation

analysis of glioma specimens from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Lab Invest*, 87(4), 392–397.

37. Capper, D., Mittelbronn, M., Meyermann, R., & Schittenhelm, J. (2008). Pitfalls in the assessment of MGMT expression and in its correlation with survival in diffuse astrocytomas: proposal of a feasible immunohistochemical approach. *Acta Neuropathol*, 115(2), 249–259.
38. Capper, D., Jones, D. T. W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., Koelsche, C., Sahm, F., Chavez, L., Reuss, D. E., Kratz, A., Wefers, A. K., Huang, K., Pajtler, K. W., Schweizer, L., Stichel, D., Olar, A., Engel, N. W., Lindenberg, K., ... Pfister, S. M. (2018). DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*, 555(7697), 469.
39. Castañeda, C. A., Casavilca, S., Orrego, E., García-Corrochano, P., Deza, P., Heinike, H., Castillo, M., Belmar-Lopez, C., & Ojeda, L. (2015). Glioblastoma: Análisis molecular y sus implicancias clínicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(2), 316–325.
40. Chaichana, K. L., Jusue-Torres, I., Navarro-Ramirez, R., Raza, S. M., Pascual-Gallego, M., Ibrahim, A., Hernandez-Hermann, M., Gomez, L., Ye, X., Weingart, J. D., Olivi, A., Blakeley, J., Gallia, G. L., Lim, M., Brem, H., & Quinones-Hinojosa, A. (2014). Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neurooncol*, 16(1), 113–122.
41. Chaichana, K. L., Zadnik, P., Weingart, J. D., Olivi, A., Gallia, G. L., Blakeley, J., Lim, M., Brem, H., & Quiñones-Hinojosa, A. (2013). Multiple resections for patients with glioblastoma: prolonging survival. *J Neurosurg*, 118(4), 812–820.

42. Chan, T. A., Weingart, J. D., Parisi, M., Hughes, M. A., Olivi, A., Borzillary, S., Alahakone, D., Detorie, N. A., Wharam, M. D., & Kleinberg, L. (2005). Treatment of recurrent glioblastoma multiforme with GliaSite brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *62*(4), 1133–1139.
43. Chang, S. M., Parney, I. F., Huang, W., Anderson, F. A., Asher, A. L., Bernstein, M., Lillehei, K. O., Brem, H., Berger, M. S., & Laws, E. R. (2005). Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. *JAMA*, *293*(5), 557–564.
44. Chang, S. M., Parney, I. F., McDermott, M., Barker, F. G., Schmidt, M. H., Huang, W., Laws, E. R., Lillehei, K. O., Bernstein, M., Brem, H., Sloan, A. E., & Berger, M. (2003). Perioperative complications and neurological outcomes of first and second craniotomies among patients enrolled in the Glioma Outcome Project. *J Neurosurg*, *98*(6), 1175–1181.
45. Charlson, M., Szatrowski, T. P., Peterson, J., & Gold, J. (1994). Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol*, *47*(11), 1245–1251.
46. Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*, *58*(5), 235–263.
47. Chen, M. W., Morsy, A. A., Liang, S., & Ng, W. H. (2016). Re-do Craniotomy for Recurrent Grade IV Glioblastomas: Impact and Outcomes from the National Neuroscience Institute Singapore. *W Neurosurg*, *87*, 439–445.
48. Chien, L. N., Gittleman, H., Ostrom, Q. T., Hung, K. S., Sloan, A. E., Hsieh, Y. C., Kruchko, C., Rogers, L. R., Wang, Y. F. G., Chiou, H. Y., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2016). Comparative Brain and Central Nervous System Tumor

Incidence and Survival between the United States and Taiwan Based on Population-Based Registry. *Front Public Health*, 4, 151.

49. Chinot, O. L., Barrié, M., Fuentes, S., Eudes, N., Lancelot, S., Metellus, P., Muracciole, X., Braguer, D., Ouafik, L., Martin, P. M., Dufour, H., & Figarella-Branger, D. (2007). Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J Clin Oncol*, 25(12), 1470–1475.
50. Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A. F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A. A., Hilton, M., Abrey, L., & Cloughesy, T. (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Eng J Med*, 370(8), 709–722.
51. Choi, C., Raisanen, J. M., Ganji, S. K., Zhang, S., McNeil, S. S., An, Z., Madan, A., Hatanpaa, K. J., Vemireddy, V., Sheppard, C. A., Oliver, D., Hulsey, K. M., Tiwari, V., Mashimo, T., Battiste, J., Barnett, S., Madden, C. J., Patel, T. R., Pan, E., ... Maher, E. A. (2016). Prospective longitudinal analysis of 2-hydroxyglutarate magnetic resonance spectroscopy identifies broad clinical utility for the management of patients with IDH-mutant glioma. *J Clin Oncol*, 34(33), 4030–4039.
52. Christmann, M., Pick, M., Lage, H., Schadendorf, D., & Kaina, B. (2001). Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int J Cancer*, 92(1), 123–129.

53. Christmann, M., Nagel, G., Horn, S., Krahn, U., Wiewrodt, D., Sommer, C., & Kaina, B. (2010). MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. *Int J Cancer*, *127*(9), 2106–2118.
54. Clark, K. H., Villano, J. L., Nikiforova, M. N., Hamilton, R. L., & Horbinski, C. (2013). 1p/19q testing has no significance in the workup of glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *39*(6), 706–717.
55. Clarke, J. L., Ennis, M. M., Yung, W. K. A., Chang, S. M., Wen, P. Y., Cloughesy, T. F., Deangelis, L. M., Robins, H. I., Lieberman, F. S., Fine, H. A., Abrey, L., Gilbert, M. R., Mehta, M., Kuhn, J. G., Aldape, K. D., Lamborn, K. R., & Prados, M. D. (2011). Is surgery at progression a prognostic marker for improved 6-month progression-free survival or overall survival for patients with recurrent glioblastoma? *Neurooncol*, *13*(10), 1118–1124.
56. Cloughesy, T. F., Mochizuki, A. Y., Orpilla, J. R., Hugo, W., Lee, A. H., Davidson, T. B., Wang, A. C., Ellingson, B. M., Rytlewski, J. A., Sanders, C. M., Kawaguchi, E. S., Du, L., Li, G., Yong, W. H., Gaffey, S. C., Cohen, A. L., Mellinghoff, I. K., Lee, E. Q., Reardon, D. A., ... Prins, R. M. (2019). Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat Med*, *25*(3), 477–486.
57. Cloughesy, T. F., Petrecca, K., Walbert, T., Butowski, N., Salacz, M., Perry, J., Damek, D., Bota, D., Bettegowda, C., Zhu, J. J., Iwamoto, F., Placantonakis, D., Kim, L., Elder, B., Kaptain, G., Cachia, D., Moshel, Y., Brem, S., Piccioni,

- D., ... Vogelbaum, M. A. (2020). Effect of Vocimagene Amiretrorepvec in Combination With Flucytosine vs Standard of Care on Survival Following Tumor Resection in Patients With Recurrent High-Grade Glioma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 6(12), 1939–1946.
58. Cocco, E., Scaltriti, M., & Drilon, A. (2018). NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 15(12), 731–747.
59. Cooper, W. A., Kohonen-Corish, M. R. J., Chan, C., Kwun, S. Y., McCaughan, B., Kennedy, C., Sutherland, R. L., & Lee, C. S. (2008). Prognostic significance of DNA repair proteins MLH1, MSH2 and MGMT expression in non-small-cell lung cancer and precursor lesions. *Histopathol*, 52(5), 613–622.
60. Corso, C. D., Bindra, R. S., & Mehta, M. P. (2017). The role of radiation in treating glioblastoma: here to stay. *J Neurooncology*, 134(3), 479–485.
61. D'Amico, R. S., Cloney, M. B., Sonabend, A. M., Zacharia, B., Nazarian, M. N., Iwamoto, F. M., Sisti, M. B., Bruce, J. N., & McKhann, G. M. (2015). The Safety of Surgery in Elderly Patients with Primary and Recurrent Glioblastoma. *W Neurosurg*, 84(4), 913–919.
62. De Bonis, P., Fiorentino, A., Anile, C., Balducci, M., Pompucci, A., Chiesa, S., Sica, G., Lama, G., Maira, G., & Mangiola, A. (2013). The impact of repeated surgery and adjuvant therapy on survival for patients with recurrent glioblastoma. *Clin Neurol Neurosurg*, 115(7), 883–886.
63. Deheeger, M., Lesniak, M. S., & Ahmed, A. U. (2014). Cellular plasticity regulated cancer stem cell niche: a possible new mechanism of chemoresistance. *Cancer Cell Microenviron*, 1(5), e295.

64. Delaney, J. C., & Essigmann, J. M. (2001). Effect of sequence context on O6-methylguanine repair and replication in vivo. *Biochemistry*, *40*(49), 14968–14975.
65. Delgado-Fernández, J., Frade-Porto, N., Blasco, G., González-Tarno, P., Gil-Simoes, R., Li, Z. Q., Rivas, P. P., & de Sola, R. G. (2020). Does reintervention improve survival in recurrent glioblastoma? Facing a temporal bias in the literature. *Acta Neurochir*, *162*(8), 1967–1975.
66. Delgado-Fernandez, J., Garcia-Pallero, M. Á., Blasco, G., Penanes, J. R., Gil-Simoes, R., Pulido, P., & Sola, R. G. (2017). Usefulness of Reintervention in Recurrent Glioblastoma: An Indispensable Weapon for Increasing Survival. *W Neurosurg*, *108*, 610–617.
67. Della Puppa, A., Persano, L., Masi, G., Rampazzo, E., Sinigaglia, A., Pistollato, F., Denaro, L., Barzon, L., Palù, G., Basso, G., Scienza, R., & d'Avella, D. (2011). MGMT expression and promoter methylation status may depend on the site of surgical sample collection within glioblastoma: a possible pitfall in stratification of patients? *J Neurooncol*, *106*(1), 33–41.
68. De Souza, R. M., Shaweis, H., Han, C., Sivasubramiam, V., Brazil, L., Beaney, R., Sadler, G., Al-Sarraj, S., Hampton, T., Logan, J., Hurwitz, V., Bhangoo, R., Gullan, R., & Ashkan, K. (2015). Has the survival of patients with glioblastoma changed over the years? *Br J Cancer*, *114*(2), 146–150.
69. Dimou, J., Beland, B., & Kelly, J. (2020). Supramaximal resection: A systematic review of its safety, efficacy and feasibility in glioblastoma. *J Clin Neurosci* *72*, 328–334.

70. Domino, J. S., Ormond, D. R., Germano, I. M., Sami, M., Ryken, T. C., & Olson, J. J. (2020). Cytoreductive surgery in the management of newly diagnosed glioblastoma in adults: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline update. *J Neurooncol*, *150*(2), 121–142.
71. Eads, C. A., Danenberg, K. D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P. V., & Laird, P. W. (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, *28*(8), 32.
72. Ening, G., Huynh, M. T., Schmieder, K., & Brenke, C. (2015). Repeat-surgery at Glioblastoma recurrence, when and why to operate? *Clin Neurol Neurosurg*, *136*, 89–94.
73. Eskilsson, E., Røsland, G. v., Solecki, G., Wang, Q., Harter, P. N., Graziani, G., Verhaak, R. G. W., Winkler, F., Bjerkvig, R., & Miletic, H. (2018). EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neurooncol*, *20*(6), 743–752.
74. Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, *343*(19), 1350–1354.
75. Everhard, S., Tost, J., el Abdalaoui, H., Crinière, E., Busato, F., Marie, Y., Gut, I. G., Sanson, M., Mokhtari, K., Laigle-Donadey, F., Hoang-Xuan, K., Delattre, J. Y., & Thillet, J. (2009). Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neurooncol*, *11*(4), 348–356.
76. Fabrini, M. G., Silvano, G., Lolli, I., Perrone, F., Marsella, A., Scotti, V., & Cionini, L. (2009). A multi-institutional phase II study on second-line

- Fotemustine chemotherapy in recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*, 92(1), 79–86.
77. Feinberg, A. P. (2018a). The Key Role of Epigenetics in Human Disease Prevention and Mitigation. *N Eng J Med*, 378(14), 1323–1334.
78. Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 111(1), 47–54.
79. Feldheim, J., Kessler, A. F., Monoranu, C. M., Ernestus, R. I., Löhr, M., & Hagemann, C. (2019). Changes of O⁶-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation in Glioblastoma Relapse-A Meta-Analysis Type Literature Review. *Cancers*, 11(12).
80. Felsberg, J., Rapp, M., Loeser, S., Fimmers, R., Stummer, W., Goepfert, M., Steiger, H. J., Friedensdorf, B., Reifenberger, G., & Sabel, M. C. (2009). Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res*, 15(21), 6683–6693.
81. Felsberg, J., Thon, N., Eigenbrod, S., Hentschel, B., Sabel, M. C., Westphal, M., Schackert, G., Kreth, F. W., Pietsch, T., Löffler, M., Weller, M., Reifenberger, G., & Tonn, J. C. (2011). Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer*, 129(3), 659–670.
82. Filippini, G., Falcone, C., Boiardi, A., Broggi, G., Bruzzone, M. G., Caldiroli, D., Farina, R., Farinotti, M., Fariselli, L., Finocchiaro, G., Giombini, S., Pollo, B., Savoiaro, M., Solero, C. L., Valsecchi, M. G., & Brain Cancer Register of the Fondazione IRCCS (Istituto Ricovero e Cura a Carattere Scientifico) Istituto Neurologico Carlo Besta (2008). Prognostic factors for survival in 676

- consecutive patients with newly diagnosed primary glioblastoma. *Neurooncol*, 10(1), 79–87.
83. Fisher, L. D., & Lin, D. Y. (1999). Time-dependent covariates in the Cox proportional-hazards regression model. *Ann Rev Pub Health*, 20, 145–157.
84. Flores-Ruiz, E., Miranda-Novales, M. G., & Villasís-Keever, M. Á. (2017). El protocolo de investigación VI: cómo elegir la prueba estadística adecuada. Estadística inferencial. *Rev Alergia Mex*, 64(3), 364–370.
85. Fountain, D. M., Bryant, A., Barone, D. G., Waqar, M., Hart, M. G., Bulbeck, H., Kernohan, A., Watts, C., & Jenkinson, M. D. (2021). Intraoperative imaging technology to maximise extent of resection for glioma: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*, 1(1): CD013630.
86. Franceschi, E., Bartolotti, M., Tosoni, A., Bartolini, S., Sturiale, C., Fioravanti, A., Pozzati, E., Galzio, R., Talacchi, A., Volpin, L., Morandi, L., Danieli, D., Ermani, M., & Brandes, A. A. (2015). The effect of re-operation on survival in patients with recurrent glioblastoma. *Anticancer Res*, 35(3), 1743–1748.
87. Friedman, H. S., Prados, M. D., Wen, P. Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L. E., Yung, W. K. A., Paleologos, N., Nicholas, M. K., Jensen, R., Vredenburgh, J., Huang, J., Zheng, M., & Cloughesy, T. (2009). Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*, 27(28), 4733–4740.
88. Germano, I. M., Johnson, D. R., Patrick, H. H., Goodman, A. L., Ziu, M., Ormond, D. R., & Olson, J. J. (2022). Congress of Neurological Surgeons Systematic Review and Evidence-Based Guidelines on the Management of

- Progressive Glioblastoma in Adults: Update of the 2014 Guidelines. *Neurosurg*, 90(5), 649–652.
89. Gerson, S. L. (2004). MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 4(4), 296–307.
90. Gilbert, M. R., Dignam, J. J., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Blumenthal, D. T., Vogelbaum, M. A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, P. D., Jaeckle, K. A., Schiff, D., Stieber, V. W., Brachman, D. G., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, I. W., Sulman, E. P., ... Mehta, M. P. (2014). A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Eng J Med*, 370(8), 699.
91. Gittleman, H., Lim, D., Kattan, M. W., Chakravarti, A., Gilbert, M. R., Lassman, A. B., Lo, S. S., MacHtay, M., Sloan, A. E., Sulman, E. P., Tian, D., Vogelbaum, M. A., Wang, T. J. C., Penas-Prado, M., Youssef, E., Blumenthal, D. T., Zhang, P., Mehta, M. P., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2017). An independently validated nomogram for individualized estimation of survival among patients with newly diagnosed glioblastoma: NRG Oncology RTOG 0525 and 0825. *Neurooncol*, 19(5), 669–677.
92. Goldman, D. A., Hovinga, K., Reiner, A. S., Esquenazi, Y., Tabar, V., & Panageas, K. S. (2018). The relationship between repeat resection and overall survival in patients with glioblastoma: A time-dependent analysis. *J Neurosurg*, 129(5), 1231–1239.
93. Gorlia, T., Stupp, R., Brandes, A. A., Rampling, R. R., Fumoleau, P., Dittrich, C., Campone, M. M., Twelves, C. C., Raymond, E., Hegi, M. E., Lacombe, D., & Van Den Bent, M. J. (2012). New prognostic factors and calculators for

- outcome prediction in patients with recurrent glioblastoma: A pooled analysis of EORTC Brain Tumour Group phase I and II clinical trials. *Eur J Cancer*, 48(8), 1176–1184.
94. Gramatzki, D., Dehler, S., Rushing, E. J., Zaugg, K., Hofer, S., Yonekawa, Y., Bertalanffy, H., Valavanis, A., Korol, D., Rohrmann, S., Pless, M., Oberle, J., Roth, P., Ohgaki, H., & Weller, M. (2016). Glioblastoma in the Canton of Zurich, Switzerland revisited: 2005 to 2009. *Cancer*, 122(14), 2206–2215.
95. Grasbon-Frodl, E. M., Kreth, F. W., Ruitter, M., Schnell, O., Bise, K., Felsberg, J., Reifenberger, G., Tonn, J. C., & Kretzschmar, H. A. (2007). Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer*, 121(11), 2458–2464.
96. *Guías Clínicas de la NCCN* (2021).
<https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1425>
97. Guo, J. U., Ma, D. K., Mo, H., Ball, M. P., Jang, M. H., Bonaguidi, M. A., Balazer, J. A., Eaves, H. L., Xie, B., Ford, E., Zhang, K., Ming, G. L., Gao, Y., & Song, H. (2011). Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci*, 14(10), 1345–1351.
98. Gurrieri, L., de Carlo, E., Gerratana, L., de Maglio, G., Macerelli, M., Pisa, F. E., Masiero, E., Aprile, G., Follador, A., Puglisi, F., Fasola, G., Rizzato, S., & Pizzolitto, S. (2018). MGMT pyrosequencing-based cut-off methylation level and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Future Oncol* 14(8), 699–707.

99. Gussyatiner, O., & Hegi, M. E. (2018). Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Sem Cancer Biol*, *51*, 50–58.
100. Guzmán-De-Villoria, J. A., Fernández-García, P., Mateos-Pérez, J. M., & Desco, M. (2012). Studying cerebral perfusion using magnetic susceptibility techniques: Technique and applications. *Radiologia*, *54*(3), 208–220.
101. Hager, J., Herrmann, E., Kammerer, S., Dinc, N., Won, S. Y., Senft, C., Seifert, V., Marquardt, G., & Quick-Weller, J. (2018). Impact of resection on overall survival of recurrent Glioblastoma in elderly patients. *Clin Neurol Neurosurg*, *174*, 21–25.
102. Hamilton, M. G., Roldán, G., Magliocco, A., McIntyre, J. B., Parney, I., & Easaw, J. C. (2011). Determination of the methylation status of MGMT in different regions within glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, *102*(2), 255–260.
103. Harris, L. C., Remack, J. S., & Brent, T. P. (1994). Identification of a 59 bp enhancer located at the first exon/intron boundary of the human O⁶-methylguanine DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res*, *22*(22), 4614–4619.
104. Harsh IV, G. R., Levin, V. A., Gutin, P. H., Seager, M., Silver, P., & Wilson, C. B. (1987). Reoperation for recurrent glioblastoma and anaplastic astrocytoma. *Neurosurg*, *21*(5), 615–621.
105. Hegi, M. E., Diserens, A. C., Godard, S., Dietrich, P. Y., Regli, L., Ostermann, S., Otten, P., van Melle, G., de Tribolet, N., & Stupp, R. (2004). Clinical trial substantiates the predictive value of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase

- promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res*, 10(6), 1871–1874.
106. Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Eng J Med*, 352(10), 997–1003.
107. Hegi, M. E., Liu, L., Herman, J. G., Stupp, R., Wick, W., Weller, M., Mehta, M. P., & Gilbert, M. R. (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*, 26(25), 4189–4199.
108. Helseth, R., Helseth, E., Johannesen, T. B., Langberg, C. W., Lote, K., Rønning, P., Scheie, D., Vik, A., & Meling, T. R. (2010). Overall survival, prognostic factors, and repeated surgery in a consecutive series of 516 patients with glioblastoma multiforme. *Acta Neurol Scand*, 122(3), 159–167.
109. Herath, N. I., Walsh, M. D., Kew, M., Smith, J. L., Jass, J. R., Young, J., Leggett, B. A., & Macdonald, G. A. (2007). Silencing of O6-methylguanine DNA methyltransferase in the absence of promoter hypermethylation in hepatocellular carcinomas from Australia and South Africa. *Oncol Rep*, 17(4), 817–822.
110. Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D., & Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18), 9821–9826.

111. Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New Eng J Med*, 349(21), 2042–2054.
112. Herrlinger, U., Schäfer, N., Steinbach, J. P., Weyerbrock, A., Hau, P., Goldbrunner, R., Friedrich, F., Rohde, V., Ringel, F., Schlegel, U., Sabel, M., Ronellenfitsch, M. W., Uhl, M., Maciaczyk, J., Grau, S., Schnell, O., Hänel, M., Krex, D., Vajkoczy, P., ... Glas, M. (2016). Bevacizumab Plus Irinotecan Versus Temozolomide in Newly Diagnosed O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Nonmethylated Glioblastoma: The Randomized GLARIUS Trial. *J Clin Oncol*, 34(14), 1611–1619.
113. Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., Hau, P., Kortmann, R. D., Krex, D., Grauer, O., Goldbrunner, R., Schnell, O., Bähr, O., Uhl, M., Seidel, C., Tabatabai, G., Kowalski, T., Ringel, F., Schmidt-Graf, F., ... Glas, M. (2019). Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 393(10172), 678–688.
114. Hervey-Jumper, S. L., & Berger, M. S. (2014). Reoperation for recurrent high-grade glioma: a current perspective of the literature. *Neurosurg*, 75(5), 491–498.
115. Hill, C., Hunter, S. B., & Brat, D. J. (2003). Genetic markers in glioblastoma: Prognostic significance and future therapeutic implications. *Adv Anat Pathol*, 10(4), 212-217.
116. Hochberg, F. H., & Pruitt, A. (1980). Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurol*, 30(9), 907–911.

117. Houillier, C., Lejeune, J., Benouaich-Amiel, A., Laigle-Donadey, F., Criniere, E., Mokhtari, K., Thillet, J., Delattre, J. Y., Hoang-Xuan, K., & Sanson, M. (2006). Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer*, *106*(10), 2218–2223.
118. Hu, L. S., Hawkins-Daarud, A., Wang, L., Li, J., & Swanson, K. R. (2020). Imaging of intratumoral heterogeneity in high-grade glioma. *Cancer Lett*, *477*, 97–106.
119. Hu, W., Liu, H., Li, Z., Liu, J., & Chen, L. (2022). Impact of molecular and clinical variables on survival outcome with immunotherapy for glioblastoma patients: A systematic review and meta-analysis. *CNS Neurosci Ther*, *28*(10), 1476–1491
120. Hudson, A. L., Parker, N. R., Khong, P., Parkinson, J. F., Dwight, T., Ikin, R. J., Zhu, Y., Chen, J., Wheeler, H. R., & Howell, V. M. (2018). Glioblastoma Recurrence Correlates With Increased APE1 and Polarization Toward an Immuno-Suppressive Microenvironment. *Front Oncol*, *8*, 314.
121. Hunter, P. (2007). The silence of genes. Is genomic imprinting the software of evolution or just a battleground for gender conflict? *EMBO Rep*, *8*(5), 441–443.
122. Ibáñez, F. A. L., Hem, S., Ajler, P., Vecchi, E., Ciruolo, C., Baccanelli, M., Tramontano, R., Knezevich, F., & Carrizo, A. (2011). A new classification of complications in neurosurgery. *W Neurosurg*, *75*(5–6), 709–715.
123. Ichimura, K., Pearson, D. M., Kocialkowski, S., Bäcklund, L. M., Chan, R., Jones, D. T., & Collins, V. P. (2009). IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neurooncol*, *11*(4), 341–347.

124. Incekara, F., Smits, M., Dirven, L., Bos, E. M., Balvers, R. K., Haitsma, I. K., Schouten, J. W., & Vincent, A. J. P. E. (2021). Intraoperative B-Mode Ultrasound Guided Surgery and the Extent of Glioblastoma Resection: A Randomized Controlled Trial. *Front Oncol*, *11*, 649797.
125. Inoue, R., Isono, M., Abe, M., Abe, T., & Kobayashi, H. (2003). A genotype of the polymorphic DNA repair gene MGMT is associated with de novo glioblastoma. *Neurol Res*, *25*(8), 875–879.
126. Jackson, C., Choi, J., Khalafallah, A. M., Price, C., Bettgowda, C., Lim, M., Gallia, G., Weingart, J., Brem, H., & Mukherjee, D. (2020). A systematic review and meta-analysis of supratotal versus gross total resection for glioblastoma. *J Neurooncol*, *148*(3), 419–431.
127. Jackson, R. J., Fuller, G. N., Abi-Said, D., Lang, F. F., Gokaslan, Z. L., Shi, W. M., Wildrick, D. M., & Sawaya, R. (2001). Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas. *Neurooncol*, *3*(3), 193–200.
128. Jaeckle, K. A., Eyre, H. J., Townsend, J. J., Schulman, S., Knudson, H. M., Belanich, M., Yarosh, D. B., Bearman, S. I., Giroux, D. J., & Schold, S. C. (1998). Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*, *16*(10), 3310–3315.
129. Jager, K. J., van Dijk, P. C., Zoccali, C., & Dekker, F. W. (2008). The analysis of survival data: the Kaplan–Meier method. *Kidney Int*, *74*(5), 560–565.

130. Jatoi, I., Anderson, W. F., Jeong, J. H., & Redmond, C. K. (2011). Breast cancer adjuvant therapy: time to consider its time-dependent effects. *J Clin Oncol*, *29*(17), 2301–2304.
131. Jeuken, J. W. M., Cornelissen, S. J. B., Vriezen, M., Dekkers, M. M. G., Errami, A., Sijben, A., Boots-Sprenger, S. H. E., & Wesseling, P. (2007). MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest*, *87*(10), 1055–1065.
132. Ji, D., Lin, K., Song, J., & Wang, Y. (2014). Effects of Tet-induced oxidation products of 5-methylcytosine on Dnmt1- and DNMT3a-mediated cytosine methylation. *Mol Biosyst*, *10*(7), 1749–1752.
133. Jung, T. Y., Jung, S., Moon, K. S., Kim, I. Y., Kang, S. S., Kim, Y. H., Park, C. S., & Lee, K. H. (2010). Changes of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma. *Oncol Rep*, *23*(5), 1269–1276.
134. Kamath, A. A., Friedman, D. D., Akbari, S. H. A., Kim, A. H., Tao, Y., Luo, J., & Leuthardt, E. C. (2019). Glioblastoma Treated With Magnetic Resonance Imaging-Guided Laser Interstitial Thermal Therapy: Safety, Efficacy, and Outcomes. *Neurosurg*, *84*(4), 836–843.
135. Kim, H. R., Kim, K. H., Kong, D. S., Seol, H. J., Nam, D. H., Lim, D. H., & Lee, J. il. (2015). Outcome of salvage treatment for recurrent glioblastoma. *J Clin Neurosci*, *22*(3), 468–473.
136. Kitange, G. J., Mladek, A. C., Carlson, B. L., Schroeder, M. A., Pokorny, J. L., Cen, L., Decker, P. A., Wu, W., Lomberk, G. A., Gupta, S. K., Urrutia, R. A., &

- Sarkaria, J. N. (2012). Inhibition of histone deacetylation potentiates the evolution of acquired temozolomide resistance linked to MGMT upregulation in glioblastoma xenografts. *Clin Cancer Res*, *18*(15), 4070–4079.
137. Knobbe, C. B., Merlo, A., & Reifenberger, G. (2002). Pten signaling in gliomas. *Neurooncol*, *4*(3), 196–211.
138. Knudson A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*, *1*(2), 157–162.
139. Komine, C., Watanabe, T., Katayama, Y., Yoshino, A., Yokoyama, T., & Fukushima, T. (2003). Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase is an independent predictor of shortened progression free survival in patients with low-grade diffuse astrocytomas. *Brain Pathol*, *13*(2), 176–184.
140. Korja, M., Raj, R., Seppä, K., Luostarinen, T., Malila, N., Seppälä, M., Mäenpää, H., & Pitkaniemi, J. (2019). Glioblastoma survival is improving despite increasing incidence rates: a nationwide study between 2000 and 2013 in Finland. *Neurooncol*, *21*(3), 370–379.
141. Kreth, S., Limbeck, E., Hinske, L. C., Schütz, S. V., Thon, N., Hoefig, K., Egensperger, R., & Kreth, F. W. (2013). In human glioblastomas transcript elongation by alternative polyadenylation and miRNA targeting is a potent mechanism of MGMT silencing. *Acta Neuropathol*, *125*(5), 671–681.
142. Lacroix, M., Abi-Said, D., Fournay, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F. F., McCutcheon, I. E., Hassenbusch, S. J., Holland, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D., & Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416

- patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*, 95(2), 190–198.
143. Landy, H. J., Feun, L., Schwade, J. G., Snodgrass, S., Lu, Y., & Gutman, F. (1994). Retreatment of intracranial gliomas. *South Med J*, 87(2), 211–214.
144. Laplant, Q., Vialou, V., Covington, H. E., Dumitriu, D., Feng, J., Warren, B. L., Maze, I., Dietz, D. M., Watts, E. L., Iñiguez, S. D., Koo, J. W., Mouzon, E., Renthal, W., Hollis, F., Wang, H., Noonan, M. A., Ren, Y., Eisch, A. J., Bolaños, C. A., ... Nestler, E. J. (2010). DNMT3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, 13(9), 1137–1143.
145. Lavoie, G., Estève, P. O., Laulan, N. B., Pradhan, S., & St-Pierre, Y. (2011). PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1. *BMC Biol*, 9, 31.
146. Li, J., Wang, M., Won, M., Shaw, E. G., Coughlin, C., Curran, W. J., & Mehta, M. P. (2011). Validation and simplification of the Radiation Therapy Oncology Group recursive partitioning analysis classification for glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81(3), 623–630.
147. Lim-Fat, M. J., Song, K. W., Iorgulescu, J. B., Andersen, B. M., Forst, D. A., Jordan, J. T., Gerstner, E. R., Reardon, D. A., Wen, P. Y., & Arrillaga-Romany, I. (2021). Clinical, radiological and genomic features and targeted therapy in BRAF V600E mutant adult glioblastoma. *J Neurooncol*, 152(3), 515–522.
148. Lombardi, G., Farina, P., della Puppa, A., Cecchin, D., Pambuku, A., Bellu, L., & Zagonel, V. (2014). An overview of fotemustine in high-grade gliomas: From single agent to association with bevacizumab. *BioMed Res Int*, 2014, 698542.
149. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO

- classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2), 97–109.
150. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131(6), 803–820.
151. Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neurooncol*, 23(8), 1231–1251.
152. Lovejoy, C. A., Li, W., Reisenweber, S., Thongthip, S., Bruno, J., de Lange, T., De, S., Petrini, J. H. J., Sung, P. A., Jasin, M., Rosenbluh, J., Zwang, Y., Weir, B. A., Hatton, C., Ivanova, E., Macconail, L., Hanna, M., Hahn, W. C., Lue, N. E., ... Meeker, A. K. (2012). Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of Telomeres pathway. *PLoS Genet*, 8(7), e1002772.
153. Lu, V. M., Jue, T. R., McDonald, K. L., & Rovin, R. A. (2018). The Survival Effect of Repeat Surgery at Glioblastoma Recurrence and its Trend: A Systematic Review and Meta-Analysis. *W Neurosurg*, 115, 453-459.e3.
154. Ma, L. C., Kuo, C. C., Liu, J. F., Chen, L. T., & Chang, J. Y. (2008). Transcriptional repression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase gene rendering cells hypersensitive to N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosurea in camptothecin-resistant cells. *Mol Pharmacol*, 74(2), 517–526.

155. Ma, X., Lv, Y., Liu, J., Wang, D., Huang, Q., Wang, X., Li, G., Xu, S., & Li, X. (2009). Survival analysis of 205 patients with glioblastoma multiforme: Clinical characteristics, treatment and prognosis in China. *J Clin Neurosci*, *16*(12), 1595–1598.
156. Macdonald, D. R., Cascino, T. L., Schold, S. C., & Cairncross, J. G. (1990). Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol*, *8*(7), 1277–1280.
157. Mack, S. C., Witt, H., Piro, R. M., Gu, L., Zuyderduyn, S., Stütz, A. M., Wang, X., Gallo, M., Garzia, L., Zayne, K., Zhang, X., Ramaswamy, V., Jäger, N., Jones, D. T. W., Sill, M., Pugh, T. J., Ryzhova, M., Wani, K. M., Shih, D. J. H., ... Taylor, M. D. (2014). Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. *Nat*, *506*(7489), 445–450.
158. Mansouri, A., Mansouri, S., Hachem, L. D., Klironomos, G., Vogelbaum, M. A., Bernstein, M., & Zadeh, G. (2016). The role of 5-aminolevulinic acid in enhancing surgery for high-grade glioma, its current boundaries, and future perspectives: A systematic review. *Cancer*, *122*(16), 2469–2478.
159. Maxwell, J. A., Johnson, S. P., Quinn, J. A., McLendon, R. E., Ali-Osman, F., Friedman, A. H., Herndon, J. E., Bierau, K., Bigley, J., Bigner, D. D., & Friedman, H. S. (2006). Quantitative analysis of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in malignant glioma. *Mol Cancer Ther*, *5*(10), 2531–2539.
160. McAleenan, A., Howell, A., Kernohan, A., Faulkner, C. L., Dawson, S., Wragg, C., Jefferies, S., Brandner, S., Vale, L., Higgins, J. P. T., & Kurian, K. M. (2019). Prognostic value of test(s) for O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation for predicting overall

survival in people with glioblastoma treated with temozolomide. *Cochrane Database Syst Rev*, 3(3), CD013316

161. McGirt, M. J., Chaichana, K. L., Gathinji, M., Attenello, F. J., Than, K., Olivi, A., Weingart, J. D., Brem, H., & Quiñones-Hinojosa, A. (2009). Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma: Clinical article. *J Neurosurg*, 110(1), 156–162.
162. McNamara, M. G., Lwin, Z., Jiang, H., Templeton, A. J., Zadeh, G., Bernstein, M., Chung, C., Millar, B. A., Laperriere, N., & Mason, W. P. (2014). Factors impacting survival following second surgery in patients with glioblastoma in the temozolomide treatment era, incorporating neutrophil/lymphocyte ratio and time to first progression. *J Neurooncol*, 117(1), 147–152.
163. Metellus, P., Coulibaly, B., Nanni, I., Fina, F., Eudes, N., Giorgi, R., Barrie, M., Chinot, O., Fuentes, S., Dufour, H., Ouafik, L., & Figarella-Branger, D. (2009). Prognostic impact of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort. *Cancer*, 115(20), 4783–4794.
164. Michaelsen, S. R., Christensen, I. J., Grunnet, K., Stockhausen, M. T., Broholm, H., Kosteljanetz, M., & Poulsen, H. S. (2013). 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*, 13, 402.
165. Mikeska, T., Bock, C., El-Maarri, O., Hübner, A., Ehrentraut, D., Schramm, J., Felsberg, J., Kahl, P., Büttner, R., Pietsch, T., & Waha, A. (2007). Optimization

- of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn*, 9(3), 368–381.
166. Molitoris, J. K., Rao, Y. J., Patel, R. A., Kane, L. T., Badiyan, S. N., Gittleman, H., Barnholtz-Sloan, J. S., Bentzen, S. M., Kruser, T. J., Huang, J., & Mehta, M. P. (2017). Multi-institutional external validation of a novel glioblastoma prognostic nomogram incorporating MGMT methylation. *J Neurooncol*, 134(2), 331–338.
167. Montemurro, N., Perrini, P., Blanco, M. O., & Vannozzi, R. (2016). Second surgery for recurrent glioblastoma: A concise overview of the current literature. *Clin Neurol Neurosurg*, 142, 60–64.
168. Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacol*, 38(1), 23–38.
169. Mori, S., Frederiksen, K., van Zijl, P. C. M., Stieltjes, B., Kraut, M. A., Solaiyappan, M., & Pomper, M. G. (2002). Brain white matter anatomy of tumor patients evaluated with diffusion tensor imaging. *Ann Neurol*, 51(3), 377–380.
170. Mukherjee, S., Wood, J., Liaquat, I., Stapleton, S. R., & Martin, A. J. (2020). Craniotomy for recurrent glioblastoma: Is it justified? A comparative cohort study with outcomes over 10 years. *Clin Neurol Neurosurgery*, 188, 105568.
171. Nagasaka, T., Goel, A., Notohara, K., Takahata, T., Sasamoto, H., Uchida, T., Nishida, N., Tanaka, N., Boland, C. R., & Matsubara, N. (2008). Methylation pattern of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis. *Int J Cancer*, 122(11), 2429–2436.

172. Nakagawachi, T., Soejima, H., Urano, T., Zhao, W., Higashimoto, K., Satoh, Y., Matsukura, S., Kudo, S., Kitajima, Y., Harada, H., Furukawa, K., Matsuzaki, H., Emi, M., Nakabeppu, Y., Miyazaki, K., Sekiguchi, M., & Mukai, T. (2003). Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene*, *22*(55), 8835–8844.
173. Nakasu, S., Fukami, T., Jito, J., & Matsuda, M. (2007). Prognostic significance of loss of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase expression in supratentorial diffuse low-grade astrocytoma. *Surg Neurol*, *68*(6), 603–608.
174. Narayana, A., Yamada, J., Berry, S., Shah, P., Hunt, M., Gutin, P. H., & Leibel, S. A. (2006). Intensity-modulated radiotherapy in high-grade gliomas: clinical and dosimetric results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *64*(3), 892–897.
175. Nava, F., Tramacere, I., Fittipaldo, A., Bruzzone, M. G., Dimeco, F., Fariselli, L., Finocchiaro, G., Pollo, B., Salmaggi, A., Silvani, A., Farinotti, M., & Filippini, G. (2014). Survival effect of first- and second-line treatments for patients with primary glioblastoma: a cohort study from a prospective registry, 1997-2010. *Neurooncol*, *16*(5), 719–727.
176. Neville, I. S., dos Santos, A. G., Almeida, C. C., Abaurre, L. B., Wayhs, S. Y., Feher, O., Teixeira, M. J., & Lepski, G. (2021). Reoperation for recurrent glioblastomas: What to expect? *Surg Neurol Int*, *12*(42).
177. Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (2009). IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res*, *15*(19), 6002–6007.

178. Noh, T., Mustroph, M., & Golby, A. J. (2021). Intraoperative Imaging for High-Grade Glioma Surgery. *Neurosurg Clin N Am*, 32(1), 47–54.
179. Norden, A. D., Bartolomeo, J., Tanaka, S., Drappatz, J., Ciampa, A. S., Doherty, L. M., Lafrankie, D. C., Ruland, S., Quant, E. C., Beroukhim, R., & Wen, P. Y. (2012). Safety of concurrent bevacizumab therapy and anticoagulation in glioma patients. *J Neurooncol*, 106(1), 121–125.
180. Noushmehr, H., Weisenberger, D. J., Diefes, K., Phillips, H. S., Pujara, K., Berman, B. P., Pan, F., Pelloski, C. E., Sulman, E. P., Bhat, K. P., Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Hayes, D. N., Perou, C. M., Schmidt, H. K., Ding, L., Wilson, R. K., van den Berg, D., Shen, H., ... Aldape, K. (2010). Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell*, 17(5), 510–522.
181. O'Brien, B. J., & Colen, R. R. (2014). Post-treatment imaging changes in primary brain tumors. *Curr Oncol Rep*, 16(8), 397.
182. Ochs, K., & Kaina, B. (2000). Apoptosis induced by DNA damage O⁶-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res*, 60(20), 5815–5824.
183. Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Cantor, M., Kirkner, G. J., Spiegelman, D., Makrigiorgos, G. M., Weisenberger, D. J., Laird, P. W., Loda, M., & Fuchs, C. S. (2006). Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagn*, 8(2), 209–217.

184. Oken, M. M., Creech, R. H., Tormey, D. C., Horton, J., Davis, T. E., McFadden, E. T., & Carbone, P. P. (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*, 5(6), 649–655.
185. Olar, A., Wani, K. M., Alfaro-Munoz, K. D., Heathcock, L. E., van Thuijl, H. F., Gilbert, M. R., Armstrong, T. S., Sulman, E. P., Cahill, D. P., Vera-Bolanos, E., Yuan, Y., Reijneveld, J. C., Ylstra, B., Wesseling, P., & Aldape, K. D. (2015). IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II-III diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*, 129(4), 585–596.
186. Oppenlander, M. E., Wolf, A. B., Snyder, L. A., Bina, R., Wilson, J. R., Coons, S. W., Ashby, L. S., Brachman, D., Nakaji, P., Porter, R. W., Smith, K. A., Spetzler, R. F., & Sanai, N. (2014). An extent of resection threshold for recurrent glioblastoma and its risk for neurological morbidity. *J Neurosurg*, 120(4), 846–853.
187. O'Regan, C. J., Kearney, H., Beausang, A., Farrell, M. A., Brett, F. M., Cryan, J. B., Loftus, T. E., & Buckley, P. G. (2018). Temporal stability of MGMT promoter methylation in glioblastoma patients undergoing STUPP protocol. *J Neurooncol*, 137(2), 233–240
188. Ortega, A., Sarmiento, J. M., Ly, D., Nuño, M., Mukherjee, D., Black, K. L., & Patil, C. G. (2016). Multiple resections and survival of recurrent glioblastoma patients in the temozolomide era. *J Clin Neurosci*, 24, 105–111.
189. Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous

System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neurooncol*, 23(12 Suppl 2), iii1–iii105.

190. Pace, A., Dirven, L., Koekkoek, J. A. F., Golla, H., Fleming, J., Rudà, R., Marosi, C., Rhun, E. le, Grant, R., Oliver, K., Oberg, I., Bulbeck, H. J., Rooney, A. G., Henriksson, R., Pasman, H. R. W., Oberndorfer, S., Weller, M., & Taphoorn, M. J. B. (2017). European Association for Neuro-Oncology (EANO) guidelines for palliative care in adults with glioma. *Lancet Oncol*, 18(6), e330–e340.
191. Paluch, B. E., Naqash, A. R., Brumberger, Z., Nemeth, M. J., & Griffiths, E. A. (2016). Epigenetics: A primer for clinicians. *Blood Rev* 30(4), 285–295.
192. Park, C. K., Kim, J. H., Nam, D. H., Kim, C. Y., Chung, S. B., Kim, Y. H., Seol, H. J., Kim, T. M., Choi, S. H., Lee, S. H., Heo, D. S., Kim, I. H., Kim, D. G., & Jung, H. W. (2013). A practical scoring system to determine whether to proceed with surgical resection in recurrent glioblastoma. *Neurooncol*, 15(8), 1096–1101.
193. Park, C.-K., Kim, J. E., Kim, J. Y., Song, S. W., Kim, J. W., Choi, S. H., Kim, T. M., Lee, S.-H., Kim, I. H., & Park, S.-H. (2012). The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas. *Transl Oncol*, 5(5), 393.
194. Park, J. K., Hodges, T., Arko, L., Shen, M., dello Iacono, D., McNabb, A., Olsen Bailey, N., Kreisl, T. N., Iwamoto, F. M., Sul, J., Auh, S., Park, G. E., Fine, H. A., & Black, P. McL. (2010). Scale to Predict Survival After Surgery for Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J Clin Oncol*, 28(24), 3838–3843.

195. Parker, N. R., Hudson, A. L., Khong, P., Parkinson, J. F., Dwight, T., Ikin, R. J., Zhu, Y., Cheng, Z. J., Vafaee, F., Chen, J., Wheeler, H. R., & Howell, V. M. (2016). Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Scient Rep*, 6(1), 1–10.
196. Parkinson, J. F., Wheeler, H. R., Clarkson, A., McKenzie, C. A., Biggs, M. T., Little, N. S., Cook, R. J., Messina, M., Robinson, B. G., & McDonald, K. L. (2007). Variation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *J Neurooncol*, 87(1), 71–78.
197. Parkinson, J. F., Wheeler, H. T., & McDonald, K. L. (2008). Contribution of DNA repair mechanisms to determining chemotherapy response in high-grade glioma. *J Clin Neurosci*, 15(1), 1–8.
198. Patel, M., Au, K., Easaw, J. C., Davis, F. G., Young, K., Mehta, V., Bowden, G. N., Keough, M. B., Sankar, T., Scholtes, F., Chagnon, M., L'Espérance, G., Yuan, Y., Gevry, G., Raymond, J., & Darsaut, T. E. (2022). Repeat resection in recurrent glioblastoma (3rGBM) Trial: A randomized care trial. *Neurochirurgie*, 68(3), 262-266.
199. Pegg, A. E. (2000). Repair of O⁶-alkylguanine by alkyltransferases. *Mut Res*, 462(2–3), 83–100.
200. Perrini, P., Gambacciani, C., Weiss, A., Pasqualetti, F., Delishaj, D., Paiar, F., Morganti, R., Vannozzi, R., & Lutzemberger, L. (2017). Survival outcomes following repeat surgery for recurrent glioblastoma: a single-center retrospective analysis. *J Neurooncol*, 131(3), 585–591.

201. Pistollato, F., Abbadi, S., Rampazzo, E., Persano, L., Della Puppa, A., Frasson, C., Sarto, E., Scienza, R., D'avella, D., & Basso, G. (2010). Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells*, 28(5), 851–862.
202. Preusser, M., Charles Janzer, R., Felsberg, J., Reifenberger, G., Hamou, M. F., Diserens, A. C., Stupp, R., Gorlia, T., Marosi, C., Heinzl, H., Hainfellner, J. A., & Hegi, M. (2008). Anti-O⁶-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol*, 18(4), 520–532.
203. Quick, J., Gessler, F., Dützmann, S., Hattingen, E., Harter, P. N., Weise, L. M., Franz, K., Seifert, V., & Senft, C. (2014). Benefit of tumor resection for recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*, 117(2), 365–372.
204. Rapp, M., Heinzl, A., Galldiks, N., Stoffels, G., Felsberg, J., Ewelt, C., Sabel, M., Steiger, H. J., Reifenberger, G., Beez, T., Coenen, H. H., Floeth, F. W., & Langen, K. J. (2013). Diagnostic performance of 18F-FET PET in newly diagnosed cerebral lesions suggestive of glioma. *J Nucl Med*, 54(2), 229–235.
205. Reardon, D. A., Brandes, A. A., Omuro, A., Mulholland, P., Lim, M., Wick, A., Baehring, J., Ahluwalia, M. S., Roth, P., Bähr, O., Phuphanich, S., Sepulveda, J. M., de Souza, P., Sahebjam, S., Carleton, M., Tatsuoka, K., Taitt, C., Zwirtes, R., Sampson, J., & Weller, M. (2020). Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 6(7), 1.

206. Reifenberger, G., Hentschel, B., Felsberg, J., Schackert, G., Simon, M., Schnell, O., Westphal, M., Wick, W., Pietsch, T., Loeffler, M., & Weller, M. (2012). Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int J Cancer*, *131*(6), 1342–1350.
207. Reinhardt, H. C., & Schumacher, B. (2012). The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet*, *28*(3), 128.
208. Reuss, D. E., Mamatjan, Y., Schrimpf, D., Capper, D., Hovestadt, V., Kratz, A., Sahm, F., Koelsche, C., Korshunov, A., Olar, A., Hartmann, C., Reijneveld, J. C., Wesseling, P., Unterberg, A., Platten, M., Wick, W., Herold-Mende, C., Aldape, K., & von Deimling, A. (2015). IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol*, *129*(6), 867–873.
209. Ringel, F., Pape, H., Sabel, M., Krex, D., Bock, H. C., Misch, M., Weyerbrock, A., Westermaier, T., Senft, C., Schucht, P., Meyer, B., & Simon, M. (2016). Clinical benefit from resection of recurrent glioblastomas: results of a multicenter study including 503 patients with recurrent glioblastomas undergoing surgical resection. *Neurooncol*, *18*(1), 96–104.
210. Robin, A. M., Lee, I., & Kalkanis, S. N. (2017). Reoperation for Recurrent Glioblastoma Multiforme. *Neurosurg Clin N Am*, *28*(3), 407–428.
211. Rodriguez, F. J., Thibodeau, S. N., Jenkins, R. B., Schowalter, K. v., Caron, B. L., O'Neill, B. P., David James, C., Passe, S., Slezak, J., & Giannini, C. (2008). MGMT immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *16*(1), 59–65.

212. Ryken, T. C., Kalkanis, S. N., Buatti, J. M., & Olson, J. J. (2014). The role of cytoreductive surgery in the management of progressive glioblastoma. *J Neurooncol*, *118*(3), 479–488.
213. Sacko, O., Benouaich-Amiel, A., Brandicourt, P., Niaré, M., Charni, S., Cavandoli, C., Brauge, D., Catalaa, I., Brenner, A., Moyal, E.-J., & Roux, F.-E. (2021). The Impact of Surgery on the Survival of Patients with Recurrent Glioblastoma. *Asian J Neurosurg*, *16*(1), 1.
214. Sahebjam, S., Forsyth, P. A., Tran, N. D., Arrington, J. A., Macaulay, R., Etame, A. B., Walko, C. M., Boyle, T., Peguero, E. N., Jaglal, M., Mokhtari, S., Enderling, H., Raghunand, N., Gatewood, T., Long, W., Dzierzeski, J. L., Evernden, B., Robinson, T., Wicklund, M. C., ... Yu, H. H. M. (2021). Hypofractionated stereotactic re-irradiation with pembrolizumab and bevacizumab in patients with recurrent high-grade gliomas: results from a phase I study. *Neurooncol*, *23*(4), 677–686.
215. Salvati, M., Pesce, A., Palmieri, M., Floriana Brunetto, G. M., Santoro, A., & Frati, A. (2019). The Role and Real Effect of an Iterative Surgical Approach for the Management of Recurrent High-Grade Glioma: An Observational Analytic Cohort Study. *W Neurosurg*, *124*, e480–e488.
216. Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., Hallani, S. el, Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., & Delattre, J. Y. (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol*, *27*(25), 4150–4154.
217. Sarkaria, J. N., Hu, L. S., Parney, I. F., Pafundi, D. H., Brinkmann, D. H., Laack, N. N., Giannini, C., Burns, T. C., Kizilbash, S. H., Laramy, J. K.,

- Swanson, K. R., Kaufmann, T. J., Brown, P. D., Agar, N. Y. R., Galanis, E., Buckner, J. C., & Elmquist, W. F. (2018). Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neurooncol*, *20*(2), 184–191.
218. Sastry, R. A., Shankar, G. M., Gerstner, E. R., & Curry, W. T. (2018). The impact of surgery on survival after progression of glioblastoma: A retrospective cohort analysis of a contemporary patient population. *J Clin Neurosci*, *53*, 41–47.
219. Sawhney, M., Rohatgi, N., Kaur, J., Gupta, S. D., Deo, S. V. S., Shukla, N. K., & Ralhan, R. (2007). MGMT expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with progression, nodal metastasis and poor prognosis. *Oral Oncol*, *43*(5), 515–522.
220. Scorsetti, M., Navarria, P., Pessina, F., Ascolese, A. M., D'Agostino, G., Tomatis, S., de Rose, F., Villa, E., Maggi, G., Simonelli, M., Clerici, E., Soffietti, R., Santoro, A., Cozzi, L., & Bello, L. (2015). Multimodality therapy approaches, local and systemic treatment, compared with chemotherapy alone in recurrent glioblastoma. *BMC Cancer*, *15*(1), 1–7.
221. Senft, C., Bink, A., Franz, K., Vatter, H., Gasser, T., & Seifert, V. (2011). Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet. Oncol*, *12*(11), 997–1003.
222. Shah, A. H., Mahavadi, A., Di, L., Sanjurjo, A., Eichberg, D. G., Borowy, V., Figueroa, J., Luther, E., de la Fuente, M. I., Semonche, A., Ivan, M. E., & Komotar, R. J. (2020). Survival benefit of lobectomy for glioblastoma: moving towards radical supramaximal resection. *J Neurooncol*, *148*(3), 501.

223. Sharma, S., Salehi, F., Scheithauer, B. W., Rotondo, F., Syro, L. V., & Kovacs, K. (2009). Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Res*, 29(10), 3759–3768.
224. Shaw, R. J., Hall, G. L., Lowe, D., Liloglou, T., Field, J. K., Sloan, P., & Risk, J. M. (2008). The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: correlation of quantitative methylation data with gene expression. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 134(3), 251–256.
225. Shih, H. A., Sherman, J. C., Nachtigall, L. B., Colvin, M. K., Fullerton, B. C., Daartz, J., Winrich, B. K., Batchelor, T. T., Thornton, L. T., Mancuso, S. M., Saums, M. K., Oh, K. S., Curry, W. T., Loeffler, J. S., & Yeap, B. Y. (2015). Proton therapy for low-grade gliomas: Results from a prospective trial. *Cancer*, 121(10), 1712–1719.
226. Simon, M., Hosen, I., Gousias, K., Rachakonda, S., Heidenreich, B., Gessi, M., Schramm, J., Hemminki, K., Waha, A., & Kumar, R. (2015). TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neurooncol*, 17(1), 45–52.
227. Simon, R., & Makuch, R. W. (1984). A non-parametric graphical representation of the relationship between survival and the occurrence of an event: application to responder versus non-responder bias. *Stat Med*, 3(1), 35–44.
228. Singh, R., Lehrer, E. J., Wang, M., Perlow, H. K., Zaorsky, N. G., Trifiletti, D. M., Bovi, J., Navarria, P., Scoccianti, S., Gondi, V., Brown, P. D., & Palmer, J. D. (2021). Dose Escalated Radiation Therapy for Glioblastoma Multiforme: An

International Systematic Review and Meta-Analysis of 22 Prospective Trials.
Int J Radiat Oncol Biol Phys, 111(2), 371–384.

229. Siu, A., Wind, J. J., Iorgulescu, J. B., Chan, T. A., Yamada, Y., & Sherman, J. H. (2012). Radiation necrosis following treatment of high grade glioma--a review of the literature and current understanding. *Acta Neurochir*, 154(2), 191–201.
230. Soejima, H., Zhao, W., & Mukai, T. (2005). Epigenetic silencing of the MGMT gene in cancer. *Biochem Cell Biol*, 83(4), 429–437.
231. Srivenugopal, K. S., Yuan, X. H., Friedman, H. S., & Ali-Osman, F. (1996). Ubiquitination-dependent proteolysis of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O⁶-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochem*, 35(4), 1328–1334.
232. Srivenugopal, K. S., Shou, J., Mullapudi, S. R., Lang, F. F., Jr, Rao, J. S., & Ali-Osman, F. (2001). Enforced expression of wild-type p53 curtails the transcription of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene in human tumor cells and enhances their sensitivity to alkylating agents. *Clin Cancer Res*, 7(5), 1398–1409.
233. Srivenugopal, K. S., Mullapudi, S. R., Shou, J., Hazra, T. K., & Ali-Osman, F. (2000). Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells. *Cancer Res*, 60(2), 282–287.
234. Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41–45.

235. Storey, K., Leder, K., Hawkins-Daarud, A., Swanson, K., Ahmed, A. U., Rockne, R. C., & Foo, J. (2019). Glioblastoma Recurrence and the Role of O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter Methylation. *Clin Cancer Inform, 3*, 1–12.
236. Straube, C., Kessel, K. A., Zimmer, C., Schmidt-Graf, F., Schlegel, J., Gempt, J., Meyer, B., & Combs, S. E. (2019). A Second Course of Radiotherapy in Patients with Recurrent Malignant Gliomas: Clinical Data on Re-irradiation, Prognostic Factors, and Usefulness of Digital Biomarkers. *Curr Treat Options Oncol, 20*(9), 71.
237. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Eng J Med, 352*(10), 987–996.
238. Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D. M., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragliotto, G., Tran, D. D., Brem, S., Hottinger, A. F., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., ... Ram, Z. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA, 318*(23), 2306–2316.

239. Stupp, R., Wong, E. T., Kanner, A. A., Steinberg, D., Engelhard, H., Heidecke, V., Kirson, E. D., Taillibert, S., Liebermann, F., Dbalý, V., Ram, Z., Villano, J. L., Rainov, N., Weinberg, U., Schiff, D., Kunschner, L., Raizer, J., Honnorat, J., Sloan, A., ... Gutin, P. H. (2012). NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer*, *48*(14), 2192–2202.
240. Suchorska, B., Weller, M., Tabatabai, G., Senft, C., Hau, P., Sabel, M. C., Herrlinger, U., Ketter, R., Schlegel, U., Marosi, C., Reifenberger, G., Wick, W., Tonn, J. C., & Wirsching, H. G. (2016). Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma-results from the DIRECTOR trial. *Neurooncol*, *18*(4), 549–556.
241. Suzuki, T., Nakada, M., Yoshida, Y., Nambu, E., Furuyama, N., Kita, D., Hayashi, Y., Hayashi, Y., & Hamada, J. I. (2011). The correlation between promoter methylation status and the expression level of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in recurrent glioma. *Jpn J Clin Oncol*, *41*(2), 190–196.
242. Taal, W., Brandsma, D., de Bruin, H. G., Bromberg, J. E., Swaak-Kragten, A. T., Sillevs Smitt, P. A. E., van Es, C. A., & van den Bent, M. J. (2008). Incidence of early pseudo-progression in a cohort of malignant glioma patients treated with chemoradiation with temozolomide. *Cancer*, *113*(2), 405–410.
243. Tanaka, S., Nakada, M., Hayashi, Y., Nakada, S., Sawada-Kitamura, S., Furuyama, N., Suzuki, T., Kamide, T., Hayashi, Y., Yano, S., & Hamada, J. I. (2010). Epithelioid glioblastoma changed to typical glioblastoma: the methylation status of MGMT promoter and 5-ALA fluorescence. *Brain Tumor Pathol*, *28*(1), 59–64.

244. Tanaka, S., Oka, H., Fujii, K., Watanabe, K., Nagao, K., & Kakimoto, A. (2005). Quantitation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene messenger RNA in gliomas by means of real-time RT-PCR and clinical response to nitrosoureas. *Cell Mol Neurobiol*, *25*(6), 1067–1071.
245. Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *23*(10), 1985–1996.
246. Thirlwell, C., Eymard, M., Feber, A., Teschendorff, A., Pearce, K., Lechner, M., Widschwendter, M., & Beck, S. (2010). Genome-wide DNA methylation analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue using the Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip. *Methods*, *52*(3), 248–254.
247. Thomas, C., Sill, M., Ruland, V., Witten, A., Hartung, S., Kordes, U., Jeibmann, A., Beschoner, R., Keyvani, K., Bergmann, M., Mittelbronn, M., Pietsch, T., Felsberg, J., Monoranu, C. M., Varlet, P., Hauser, P., Olar, A., Grundy, R. G., Wolff, J. E., ... Hasselblatt, M. (2016). Methylation profiling of choroid plexus tumors reveals 3 clinically distinct subgroups. *Neurooncol*, *18*(6), 790–796.
248. Tomicic, M. T., Dawood, M., & Efferth, T. (2021). Epigenetic Alterations Upstream and Downstream of p53 Signaling in Colorectal Carcinoma. *Cancers*, *13*(16), 4072.
249. Tsien, C., Pugh, S., Dicker, A., Raizer, J., Matuszak, M., Lallana, E., Huang, J., Algan, O., Taylor, N., Portelance, L., Villano, J., Hamm, J., Oh, K., Ali Jr, A., Kim, M., Lindhorst, S., Mehta, M., Arbor, A., Permanente, K., ... Chakravarti,

- A. (2019). Randomized Phase II Trial of Re-Irradiation and Concurrent Bevacizumab versus Bevacizumab Alone as Treatment for Recurrent Glioblastoma (NRG Oncology/RTOG 1205): Initial Outcomes and RT Plan Quality Report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *105*(1), S78.
250. Tully, P. A., Gogos, A. J., Love, C., Liew, D., Drummond, K. J., & Morokoff, A. P. (2016). Reoperation for Recurrent Glioblastoma and Its Association With Survival Benefit. *Neurosurg*, *79*(5), 678–689.
251. Ueda, S., Mineta, T., Nakahara, Y., Okamoto, H., Shiraishi, T., & Tabuchi, K. (2004). Induction of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by dexamethasone in glioblastomas. *J Neurosurg*, *101*(4), 659–663.
252. Vallot, C., Ouimette, J. F., & Rougeulle, C. (2016). Establishment of X chromosome inactivation and epigenomic features of the inactive X depend on cellular contexts. *BioEssays*, *38*(9), 869–880.
253. Van den Bent, M., Eoli, M., Sepulveda, J. M., Smits, M., Walenkamp, A., Frenel, J. S., Franceschi, E., Clement, P. M., Chinot, O., de Vos, F., Whenham, N., Sanghera, P., Weller, M., Dubbink, H. J., French, P., Looman, J., Dey, J., Dey, J., Krause, S., ... Golfopoulos, V. (2020). INTELLANCE 2/EORTC 1410 randomized phase II study of Depatux-M alone and with temozolomide vs temozolomide or lomustine in recurrent EGFR amplified glioblastoma. *Neurooncol*, *22*(5), 684–693.
254. Van Linde, M. E., Brahm, C. G., de Witt Hamer, P. C., Reijneveld, J. C., Bruynzeel, A. M. E., Vandertop, W. P., van de Ven, P. M., Wagemakers, M., van der Weide, H. L., Enting, R. H., Walenkamp, A. M. E., & Verheul, H. M. W.

- (2017). Treatment outcome of patients with recurrent glioblastoma multiforme: a retrospective multicenter analysis. *J Neurooncol*, *135*(1), 183–192.
255. Van Walraven, C., Davis, D., Forster, A. J., & Wells, G. A. (2004). Time-dependent bias was common in survival analyses published in leading clinical journals. *J Clin Epidemiol*, *57*(7), 672–682.
256. Vineis, P., Chatziioannou, A., Cunliffe, V. T., Flanagan, J. M., Hanson, M., Kirsch-Volders, M., & Kyrtopoulos, S. (2017). Epigenetic memory in response to environmental stressors. *FASEB J*, *31*(6), 2241–2251.
257. Vlassenbroeck, I., Califice, S., Diserens, A. C., Migliavacca, E., Straub, J., Di Stefano, I., Moreau, F., Hamou, M. F., Renard, I., Delorenzi, M., Flamion, B., DiGuseppi, J., Bierau, K., & Hegi, M. E. (2008). Validation of real-time methylation-specific PCR to determine O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter methylation in glioma. *J Mol Diagn*, *10*(4), 332–337.
258. Wakkee, M., Hollestein, L. M., & Nijsten, T. (2014). Multivariable Analysis. *J Invest Dermatol*, *134*(5), 1–5.
259. Wang, L., Li, Z., Liu, C., Chen, L., Liu, L., Hu, Z., Zhao, L., Lu, D., & Teng, L. (2017). Comparative assessment of three methods to analyze MGMT methylation status in a series of 350 gliomas and gangliogliomas. *Pathol Res Pract*, *213*(12), 1489–1493.
260. Wann, A., Tully, P. A., Barnes, E. H., Lwin, Z., Jeffree, R., Drummond, K. J., Gan, H., & Khasraw, M. (2018). Outcomes after second surgery for recurrent glioblastoma: a retrospective case–control study. *J Neurooncol*, *137*(2), 409–415.

261. Watts, G. S., Pieper, R. O., Costello, J. F., Peng, Y. M., Dalton, W. S., & Futscher, B. W. (1997). Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol*, *17*(9), 5612–5619.
262. Weller, M., Tabatabai, G., Kästner, B., Felsberg, J., Steinbach, J. P., Wick, A., Schnell, O., Hau, P., Herrlinger, U., Sabel, M. C., Wirsching, H. G., Ketter, R., Bähr, O., Platten, M., Tonn, J. C., Schlegel, U., Marosi, C., Goldbrunner, R., Stupp, R., ... Reifenberger, G. (2015). MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin Cancer Res*, *21*(9), 2057–2064.
263. Weller, M., van den Bent, M., Tonn, J. C., Stupp, R., Preusser, M., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Henriksson, R., Rhun, E. le, Balana, C., Chinot, O., Bendszus, M., Reijneveld, J. C., Dhermain, F., French, P., Marosi, C., Watts, C., Oberg, I., Pilkington, G., Baumert, B. G., ... Wick, W. (2017). European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*, *18*(6), e315–e329.
264. Wen, P. Y., Macdonald, D. R., Reardon, D. A., Cloughesy, T. F., Sorensen, A. G., Galanis, E., Degroot, J., Wick, W., Gilbert, M. R., Lassman, A. B., Tsien, C., Mikkelsen, T., Wong, E. T., Chamberlain, M. C., Stupp, R., Lamborn, K. R., Vogelbaum, M. A., van den Bent, M. J., & Chang, S. M. (2010). Updated

- response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol*, 28(11), 1963–1972.
265. Wen, P. Y., Weller, M., Lee, E. Q., Alexander, B. M., Barnholtz-Sloan, J. S., Barthel, F. P., Batchelor, T. T., Bindra, R. S., Chang, S. M., Antonio Chiocca, E., Cloughesy, T. F., DeGroot, J. F., Galanis, E., Gilbert, M. R., Hegi, M. E., Horbinski, C., Huang, R. Y., Lassman, A. B., le Rhun, E., ... van den Bent, M. J. (2020). Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neurooncol*, 22(8), 1073–1113.
266. Wick, W., Gorlia, T., Bendszus, M., Taphoorn, M., Sahm, F., Harting, I., Brandes, A. A., Taal, W., Domont, J., Idbaih, A., Campone, M., Clement, P. M., Stupp, R., Fabbro, M., le Rhun, E., Dubois, F., Weller, M., von Deimling, A., Golfopoulos, V., ... van den Bent, M. J. (2017). Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Eng J Med*, 377(20), 1954–1963.
267. Wick, W., Weller, M., van den Bent, M., Sanson, M., Weiler, M., von Deimling, A., Plass, C., Hegi, M., Platten, M., & Reifenberger, G. (2014). MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol*, 10(7), 372–385.
268. Wiestler, B., Capper, D., Holland-Letz, T., Korshunov, A., von Deimling, A., Pfister, S. M., Platten, M., Weller, M., & Wick, W. (2013). ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol*, 126(3), 443–451.
269. Wiestler, B., Capper, D., Sill, M., Jones, D. T. W., Hovestadt, V., Sturm, D., Koelsche, C., Bertoni, A., Schweizer, L., Korshunov, A., Weiß, E. K.,

- Schliesser, M. G., Radbruch, A., Herold-Mende, C., Roth, P., Unterberg, A., Hartmann, C., Pietsch, T., Reifenberger, G., ... Wick, W. (2014). Integrated DNA methylation and copy-number profiling identify three clinically and biologically relevant groups of anaplastic glioma. *Acta Neuropathol*, *128*(4), 561–571.
270. Wiewrodt, D., Nagel, G., Dreimüller, N., Hundsberger, T., Perneczky, A., & Kaina, B. (2008). MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome. *Int J Cancer*, *122*(6), 1391–1399.
271. Woernle, C. M., Péus, D., Hofer, S., Rushing, E. J., Held, U., Bozinov, O., Krayenbühl, N., Weller, M., & Regli, L. (2015). Efficacy of Surgery and Further Treatment of Progressive Glioblastoma. *W Neurosurg*, *84*(2), 301–307.
272. Wojdacz, T. K., & Dobrovic, A. (2007). Methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): A new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res*, *35*(6).
273. Woodroffe, R. W., Zanaty, M., Soni, N., Mott, S. L., Helland, L. C., Pasha, A., Maley, J., Dhungana, N., Jones, K. A., Monga, V., & Greenlee, J. D. W. (2020). Survival after reoperation for recurrent glioblastoma. *J Clin Neurosci*, *73*, 118–124.
274. Woodworth, G. F., McGirt, M. J., Samdani, A., Garonzik, I., Olivi, A., & Weingart, J. D. (2006). Frameless image-guided stereotactic brain biopsy procedure: diagnostic yield, surgical morbidity, and comparison with the frame-based technique. *J Neurosurg*, *104*(2), 233–237.

275. Xiong, Z., & Laird, P. W. (1997). COBRA: A sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*, 25(12), 2532–2534.
276. Yi, J., Wang, Z. W., Cang, H., Chen, Y. Y., Zhao, R., Yu, B. M., & Tang, X. M. (2001). p16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duke's staging. *WJ Gastroenterol*, 7(5), 722–725.
277. Yong, R. L., Wu, T., Mihatov, N., Shen, M. J., Brown, M. A., Zaghloul, K. A., Park, G. E., & Park, J. K. (2014). Residual tumor volume and patient survival following reoperation for recurrent glioblastoma. *J Neurosurg*, 121(4), 802–809.
278. Yoshimoto, K., Iwaki, T., Inamura, T., Fukui, M., Tahira, T., & Hayashi, K. (2002). Multiplexed Analysis of Post-PCR Fluorescence-labeled Microsatellite Alleles and Statistical Evaluation of Their Imbalance in Brain Tumors. *Jpn J Cancer Res*, 93(3), 284–290.
279. Zanello, M., Roux, A., Ursu, R., Peeters, S., Bauchet, L., Noel, G., Guyotat, J., le Reste, P. J., Faillot, T., Litre, F., Desse, N., Emery, E., Petit, A., Peltier, J., Voirin, J., Caire, F., Barat, J. L., Vignes, J. R., Menei, P., ... Pallud, J. (2017). Recurrent glioblastomas in the elderly after maximal first-line treatment: does preserved overall condition warrant a maximal second-line treatment? *J Neurooncol*, 135(2), 285–297.
280. Zarnett, O. J., Sahgal, A., Gosio, J., Perry, J., Berger, M. S., Chang, S., & Das, S. (2015). Treatment of elderly patients with glioblastoma: a systematic evidence-based analysis. *JAMA Neurol*, 72(5), 589–596.

281. Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., Yang, Y., Setiady, I., Deveau, C., Saoud, K., Grello, C., Oxford, M., Yuan, F., & Abounader, R. (2018). The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers*, *10*(9), 297.
282. Zhao, H., Wang, S., Song, C., Zha, Y., & Li, L. (2016). The prognostic value of MGMT promoter status by pyrosequencing assay for glioblastoma patients' survival: a meta-analysis. *W J Surg Oncol* *14*(1), 261.
283. Zhao, Y.-H., Wang, Z.-F., Pan, Z.-Y., Péus, D., Delgado-Fernandez, J., Pallud, J., & Li, Z.-Q. (2019). A Meta-Analysis of Survival Outcomes Following Reoperation in Recurrent Glioblastoma: Time to Consider the Timing of Reoperation. *Front Neurol*, *10*, 286.
284. Ziegler, D. S., Wong, M., Mayoh, C., Kumar, A., Tsoli, M., Mould, E., Tyrrell, V., Khuong-Quang, D. A., Pinese, M., Gayevskiy, V., Cohn, R. J., Lau, L., Reynolds, M., Cox, M. C., Gifford, A., Rodriguez, M., Cowley, M. J., Ekert, P. G., Marshall, G. M., & Haber, M. (2018). Brief Report: Potent clinical and radiological response to larotrectinib in TRK fusion-driven high-grade glioma. *Br J Cancer*, *119*(6), 693–696.

ANEXOS

