

ESTUDIO GENÉTICO DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *MGMT*

El Glioblastoma Multiforme (GBM) es el subtipo más maligno de glioma, y el tumor cerebral primario más común en el adulto. Es un tumor de mal pronóstico, con una supervivencia media de 15 meses y de 24 meses en el 26-33% de los pacientes (1). El GBM tiene una incidencia máxima en torno a los 50 años de edad, superior en el sexo masculino. Se localiza en la zona blanca subcortical, más frecuentemente en el lóbulo temporal y frontal. Suele ser intraparenquimal con epicentro en la sustancia gris.

El tratamiento por excelencia consiste en la resección quirúrgica máxima, seguida de radioterapia más temozolomida (TMZ) concomitante y de mantenimiento (2). La TMZ es un fármaco quimioterapéutico que se administra durante un período de tiempo que va de las 6 semanas a los 14 meses (tratamiento más mantenimiento). Aproximadamente el 35% del fármaco atraviesa la barrera hematoencefálica. Se ha descrito que la respuesta asociada a la TMZ es superior en aquellos pacientes que tienen metilado el promotor del gen *MGMT*.

El gen *MGMT* se localiza en el cromosoma 10 (10q26). Codifica la enzima O⁶-metilguanidina-ADN metiltransferasa, que posee una función reparadora del ADN, transfiriendo grupos alquilo de la posición O⁶ de la guanina e impidiendo la formación de enlaces en el material genético. Esta enzima inhibe la apoptosis inducida por los agentes alquilantes terapéuticos frente al ADN tumoral.

La metilación de algunos genes implica la silenciación o no expresión de su información. En este sentido, la silenciación del gen *MGMT* a través de la metilación de su promotor se asocia a la pérdida de expresión del gen, y por tanto a una disminución de la actividad reparadora del ADN por parte de la enzima que codifica. Sabemos que el enlace entre la citosina y el grupo metilo (CH₃-) (Fig 1) impide la expresión del gen asociado.

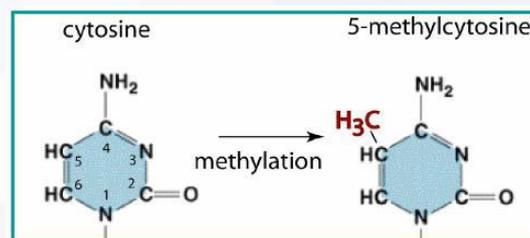


Fig 1. Metilación de la citosina a 5-metilcitosina

La expresión del gen *MGMT* se vincula a una mayor resistencia a la terapia con agentes alquilantes, moléculas extremadamente reactivas que causan muerte celular al unirse al ADN. Por el contrario, su metilación, o sea ausencia de función, permite que estos agentes terapéuticos actúen de forma más efectiva (Fig 2).

Catlab Informa

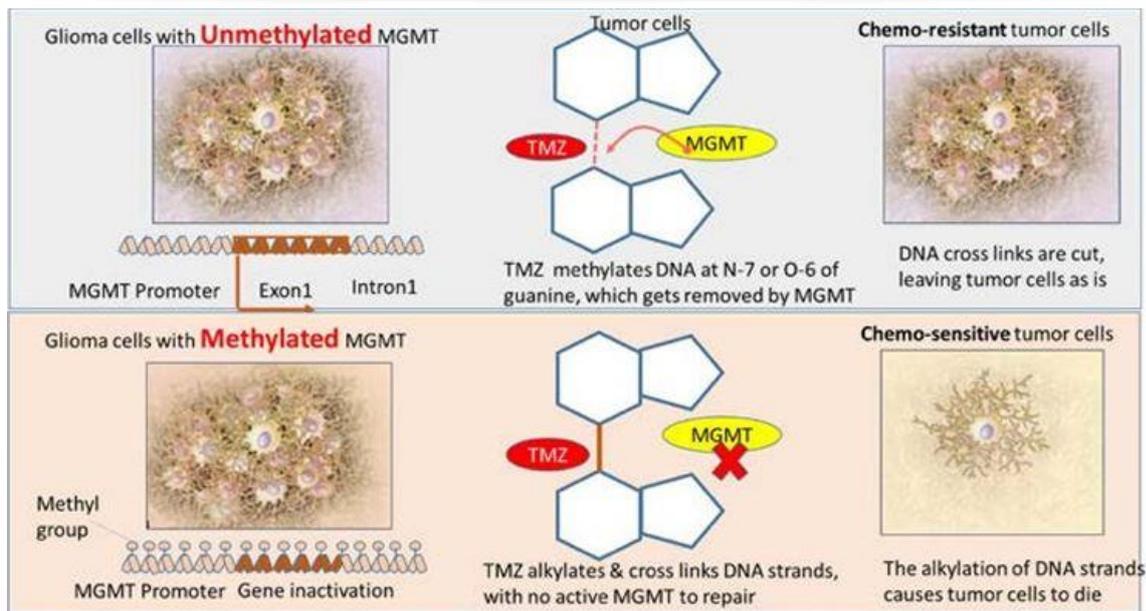


Fig 2. Mecanismo de sensibilidad a la quimioterapia (TMZ) resultante de la inactivación epigenética del gen reparador tumoral *MGMT*.

De todos los biomarcadores conocidos para el diagnóstico de GBM, existen 3 que se utilizan en la rutina del laboratorio de genética (3).

En Catlab, estudiamos dos de estos biomarcadores moleculares, relacionados con el GBM, en dos pruebas diferentes:

- Estudio genético de las variantes de los genes IDH1 y IDH2.
- Estudio de la codelección 1p/19q.

Recientemente, hemos incorporado el estudio de metilación del promotor del gen *MGMT*.

Este estudio se realiza con el kit Easy PGX ready *MGMT* kit (Diatech). Es un test que permite hacer una detección cualitativa por PCR a tiempo real y curvas de melting, del estatus de metilación de 12 islas CpG localizadas en el promotor del gen *MGMT*. Las islas CpG son regiones del ADN ricas en Citosina y Guanina normalmente ubicadas en las zonas promotoras de los genes, donde generalmente tiene lugar la metilación.

Esta prueba se realiza en muestras de tejido conservadas en parafina.

Primeramente se realiza una extracción de ADN, mediante un extractor automático MagCore nucleic acid extractor (RBC Bioscience), con el kit Magcore Genomic DNA FEPE, específico para poder trabajar con muestras parafinadas.

Catlab Informa



Extractor de ácidos nucleicos Magcore .

El ADN extraído se cuantifica mediante el espectrofotómetro molecular DS-11 Spectrophotometer (Denovix) que nos permite conocer la concentración y la calidad de la muestra obtenida.



Espectrofotómetro DS-11 Spectrophotometer (Denovix)

Seguidamente se hace un procesamiento de este ADN con bisulfito sódico, que transforma las Citosinas no metiladas en Uracilos. Durante la amplificación, el Uracilo es reemplazado por Timina. Las Citosinas metiladas permanecen sin cambios (4) (Fig. 3)

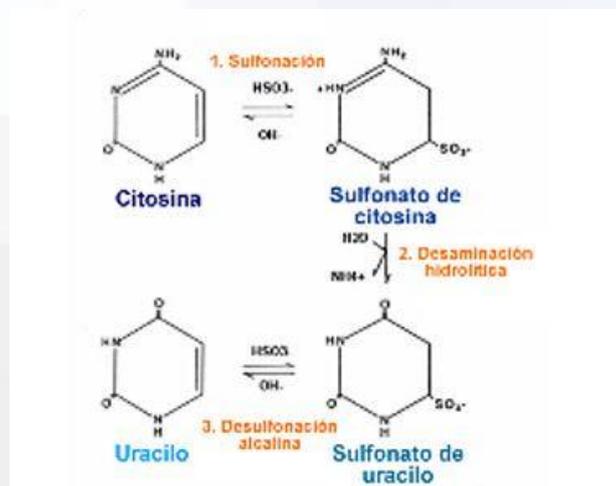


Fig. 3. Procesamiento de las citosinas con bisulfito

Catlab Informa

El ADN tratado con bisulfito se amplifica mediante una PCR a tiempo real sensible a la metilación (MSP) mediante el equipo Easy PGX (Diatech).

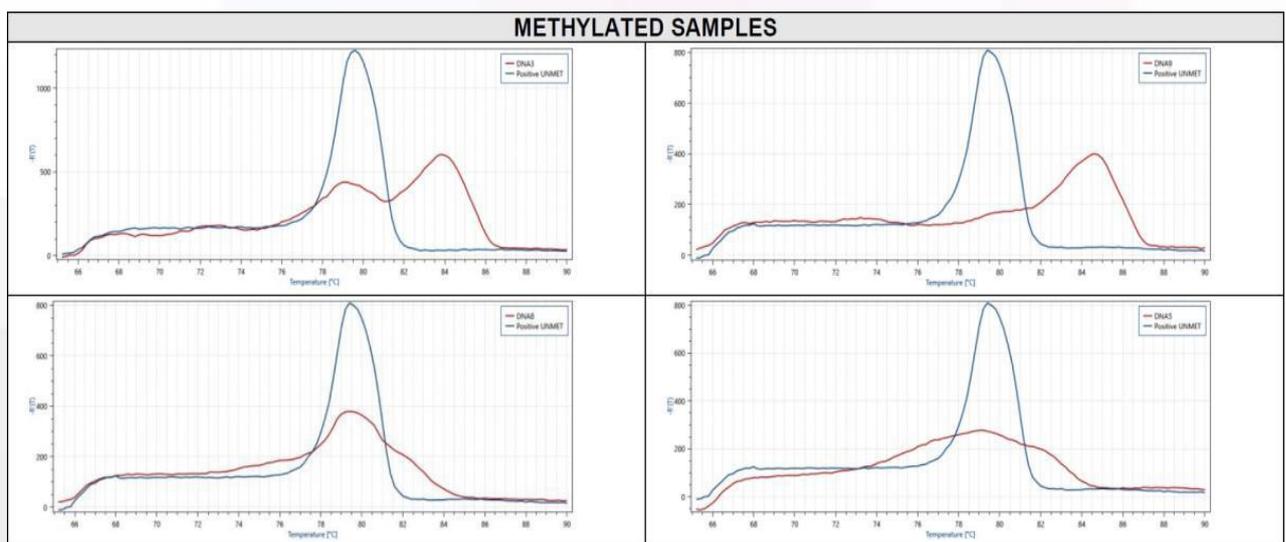


Easy PGX (Diatech)

Esta PCR utiliza cebadores específicos para amplificar los alelos metilados y los no metilados. Después del análisis de curva de fusión (melt curve), las muestras metiladas y no metiladas, debido a su diferente composición de Timina y Citosina producen picos de fusión diferenciados.

Ejemplo de resultados:

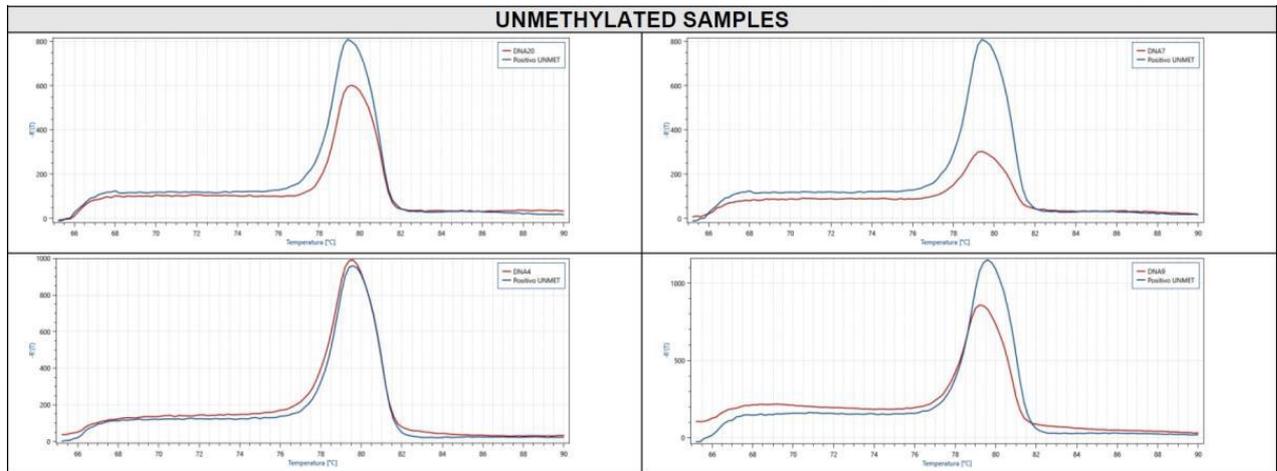
Muestra metiladas:



La curva de color azul representa el control no metilado con una temperatura de fusión de aprox . 80°C. Las muestras de color rojo metiladas poseen una temperatura de fusión de aprox 84°C.

Catlab Informa

Muestras no metiladas:



La temperatura de fusión de las muestras no metiladas coincide con el control no metilado (-).

La determinación del estado de metilación del promotor del gen MGMT, posibilita la selección de aquellos pacientes con GBM, que tendrán una mayor probabilidad de beneficiarse del tratamiento con agentes alquilantes como la Temozolamida y por tanto un pronóstico más favorable. Aquellos pacientes que no tienen metilado el promotor del gen MGMT, corresponden a un fenotipo resistente a la terapia, lo que constituye un predictor pronóstico negativo.

Bibliografía :

- 1- Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment ; Reciente Literature Review . Curro Med Chem . 2017;24(27):3002-3009.
- 2- Fernandes C, Costa A, Osório L, et al. Current Standards Care in Glioblastoma Therapy. In: De Vleeschouwer S, editor. Glioblastoma [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469987/> doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch11
- 3- Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. (2012) Molecular patología en adulto high-grade gliomas: from molecular diagnósticos to target therapies, Neuropathol Appl Neurobiol.38(3):271-291.
- 4-Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. Nucleic Acids Res. 1994 Aug 11;22(15):2990-7.

Jordi Roigé
Facultativo de la sección de Genética
CATLAB
Tel. 628.16.78.63 / 629.61.06.55
jroige@catlab.cat