

ESTUDI GENÈTIC DE LA METILACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN MGMT

El Glioblastoma Multiforme (GBM) és el subtipus més maligne de glioma, i el tumor cerebral primari més comú en l'adult. És un tumor de mal pronòstic, amb una supervivència mitja de 15 mesos, i de 24 mesos en el 26-33% dels pacients (1). El GBM té incidència màxima al voltant dels 50 anys d'edat, superior en el sexe masculí. Es localitza a la zona blanca subcortical, més freqüentment en el lòbul temporal i frontal. Sol ser intraparenquimal amb epicentre en la substància gris.

El tractament per excel·lència consisteix en la resecció quirúrgica màxima, seguida de radioteràpia més temozolomida (TMZ) concomitant i de manteniment (2). La TMZ és un fàrmac quimioterapèutic que s'administra durant un període de temps que va de les 6 setmanes als 14 mesos (tractament més manteniment). Aproximadament el 35% del fàrmac travessa la barrera hematoencefàlica. S'ha descrit que la resposta associada a la TMZ és superior en aquells pacients que tenen metilat el promotor del gen *MGMT*.

El gen *MGMT* es localitza en el cromosoma 10 (10q26). Codifica l'enzim O⁶-metilguanidina-ADN metiltransferasa, que posseeix una funció reparadora de l'ADN, transferint grups alquil de la posició O⁶ de la guanina i impedit la formació d'enllaços en el material genètic. Aquest enzim inhibeix l'apoptosi induïda pels agents alquilants terapèutics enfront de l'ADN tumoral.

La metilació d'alguns gens implica la silenciació o no expressió de la seva informació. En aquest sentit, la silenciació del gen *MGMT* a través de la metilació del seu promotor s'associa a la pèrdua d'expressió del gen, i per tant a una disminució de l'activitat reparadora de l'ADN per part de l'enzim que codifica. Sabem que l'enllaç entre la citosina i el grup metil (CH₃-) (Fig 1) impedeix l'expressió del gen associat.

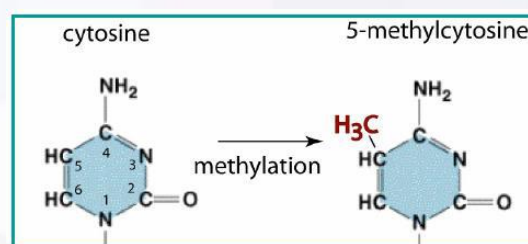


Fig 1. Metilació de la citosina a 5-metilcitosina

L'expressió del gen *MGMT* es vincula a una major resistència a la teràpia amb agents alquilants, molècules extremadament reactives que causen mort cel·lular a l'unir-se a l'ADN. Per contra, la seva metilació, o sigui absència de funció, permet que aquest agents terapèutics actuïn de forma més efectiva (Fig 2).

Catlab Informa

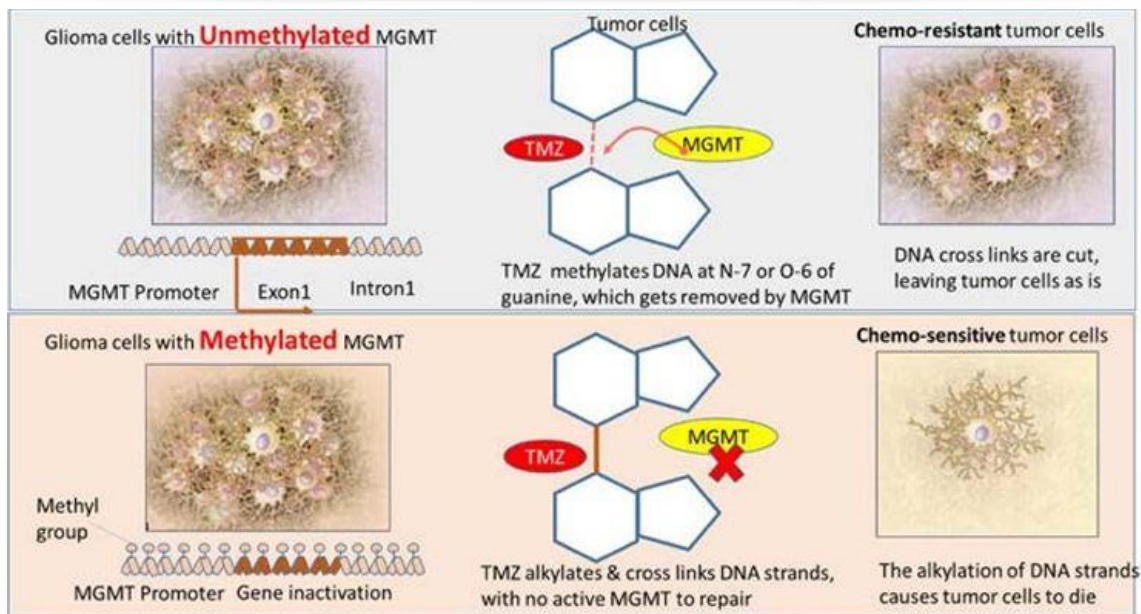


Fig 2. Mecanisme de sensibilitat a la quimioteràpia (TMZ) resultant de la inactivació epigenètica del gen reparador tumoral *MGMT*.

De tots els biomarcadors coneguts per al diagnòstic de GBM, hi ha 3 que s'utilitzen en la rutina del laboratori de genètica (3).

A Catlab, estudiem dos d'aquests biomarcadors moleculars, relacionats amb el GBM, en dues proves diferents:

- Estudi genètic de les variants dels gens *IDH1* i *IDH2*.
- Estudi de la codelecció 1p/19q.

Recentment, hem incorporat l'estudi de metilació del promotor del gen *MGMT*.

Aquest estudi es realitza amb el kit Easy PGX ready *MGMT* kit (Diatech). És un test que permet fer una detecció qualitativa per PCR a temps real i corbes de melting, de l'estatus de metilació de 12 illes CpG localitzades al promotor del gen *MGMT*. Les illes CpG són regions de l'ADN riques en Citosina i Guanina normalment situades en les zones promotores dels gens, a on generalment té lloc la metilació.

Aquesta prova es realitza en mostres de teixit conservades amb parafina.

Primerament es fa una extracció d'ADN, mitjançant un extractor automàtic MagCore nucleic acid extractor (RBC Bioscience), amb el kit Magcore Genomic DNA FEPE, específic per poder treballar amb mostres parafinades.

Catlab Informa



Extractor d'àcids nucleics Magcore.

Un cop tenim l'ADN extret, es quantifica mitjançant l'espectrofotòmetre molecular DS-11 Spectrophotometer (Denovix) que ens permet conèixer la concentració i la qualitat de la mostra obtinguda.



Espectrofotòmetre DS-11 Denovix.

Seguidament es fa un processament d'aquest ADN amb bisulfit sòdic, que transforma les Citosines no metilades en Uracils. Durant l'amplificació, l'Uracil és reemplaçat per Timina. Les Citosines metilades romanen sense canvis (4) (Fig. 3)

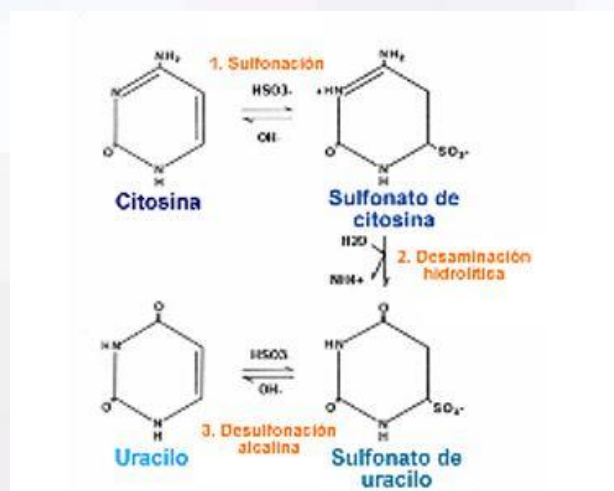


Fig. 3. Processament de les citosines amb bisulfit.

Catlab Informa

L'ADN tractat amb bisulfit s'amplifica mitjançant una PCR a temps real sensible a la metilació (MSP) mitjançant l'equip Easy PGX (Diatech)

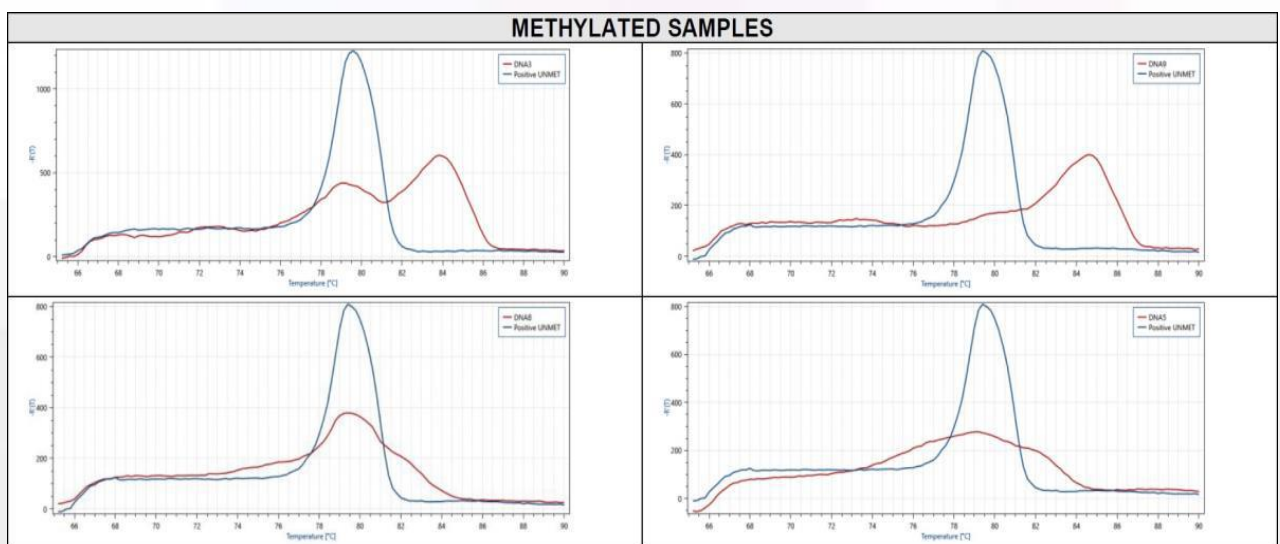


Easy PGX Diatech.

Aquesta PCR fa servir cebadors específics per amplificar els al·lels metilats i els no metilats. Després de l'anàlisi de corba de fusió (melt curve), les mostres metilades i no metilades, a causa de la seva diferent composició de Timina i Citosina produeixen pics de fusió diferenciats.

Exemple de resultats:

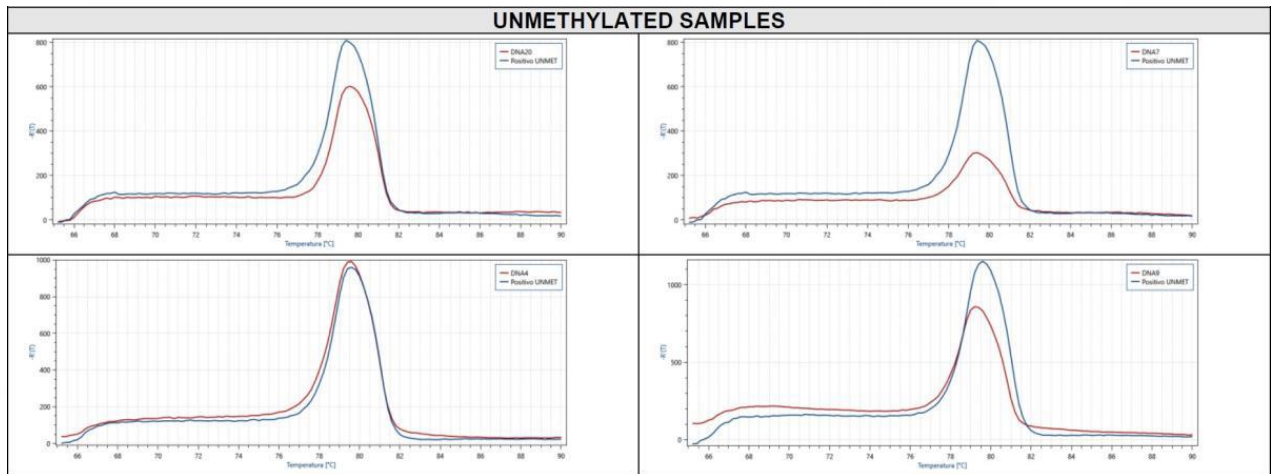
Mostra metilades:



La corba de color blau representa el control no metilat amb una temperatura de fusió d'aprox. 80°C. Les mostres de color vermell metilades tenen una temperatura de fusió d'aprox 84°C.

Catlab Informa

Mostres no metilades:



La temperatura de fusió de les mostres no metilades coincideix amb el control no metilat (-).

La determinació de l'estat de metilació del promotor del gen MGMT, possibilita la selecció d'aquells pacients amb GBM, que tindran una major probabilitat de beneficiar-se del tractament amb agents alquilants com la Temozolamida i per tant un pronòstic més favorable. Aquells pacients que no tenen metilat el promotor del gen MGMT, corresponen a un fenotip resistent a la teràpia, el que constitueix un predictor pronòstic negatiu.

Bibliografia:

1-Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Curr Med Chem*. 2017;24(27):3002-3009.

2- Fernandes C, Costa A, Osório L, et al. Current Standards of 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 pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics 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

Facultatiu de la secció de Genètica

CATLAB

Tel. 628.16.78.63 / 629.61.06.55

jroige@catlab.cat