

Expresión de O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT) en pacientes chilenos con glioblastoma multiforme

DANIEL JIMÉNEZ^{1,2,3}, JOSÉ MANUEL MATAMALA^{1,2,4},
ALESSANDRA CHITI^{1,a}, CARMEN VERGARA^{1,2}, CLAUDIA TISSERA⁵,
RÓMULO MELO^{1,2,5}, LUIS CARTIER^{1,2,3}.

O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) expression in patients with glioblastoma multiforme

Background: Patients with Glioblastoma multiforme (GBM) have a five years survival of less than 5%, but the response to chemotherapy with alkylating agents can vary depending on the methylation status of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT). Genetic testing has limitations for routine use, while immunohistochemistry (IHC) offers a fast and affordable technique but with heterogeneous results in the literature. **Aim:** To evaluate MGMT expression by IHC in tumor tissue of Chilean patients with GBM. **Material and Methods:** Tumor samples of 29 patients with a pathological diagnosis of GBM were studied. We performed IHC staining and manual analysis of positive and negative cells for MGMT expression. A cut-off of at least 10% of cells expressing MGMT was used. Demographic and clinical features of patients were obtained from clinical records. **Results:** The median number of cells counted per case was 692 (interquartile range [IQR] 492-928). Fifteen cases (52%) were positive for MGMT expression. Median overall survival was 5.3 months (IQR 3.4-12-8). The effect of MGMT expression on the therapeutic response was not studied since only 3 patients received chemotherapy. **Conclusions:** Our results are similar to international reports, but we were not able to determine the association between MGMT expression and therapeutic response.

(Rev Med Chile 2018; 146: 7-14)

Key words: Glioblastoma; Immunohistochemistry; O⁶-Methylguanine-DNA-Methyltransferase; Prognosis.

¹Laboratorio de Investigación Biomédica, Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

²Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

³Servicio de Neurología, Hospital del Salvador, Santiago, Chile.

⁴Instituto de Neurociencia Biomédica (BNI), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

⁵Laboratorio de Neuropatología. Instituto de Neurocirugía Dr. Alfonso Asenjo, Santiago, Chile.

^aInterna de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Trabajo no recibió financiamiento externo.

Recibido el 24 de julio de 2017, aceptado el 22 diciembre de 2017.

Correspondencia a:

Dr. Daniel Jiménez
Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
José Miguel Infante 553, Providencia
Santiago, Chile.
danieljimenez@med.uchile.cl

Los gliomas o tumores neurogliales representan un grupo heterogéneo de tumores cerebrales originados a partir de células gliales y ependimarias. El glioblastoma multiforme (GBM) corresponde al subtipo histológico de mayor malignidad (grado IV de la Organización Mundial de la Salud [OMS]) y representa más del 80 % de ellos^{1,2}. Se caracteriza histológicamente por presentar necrosis, proliferación vascular o

ambos, acompañado de un marcado incremento en la celularidad y pleomorfismo². Su tasa de incidencia varía entre 0,59 y 3,69 por 100.000 personas³ y la supervivencia a 5 años se mantiene en 5%, a pesar de los avances en su tratamiento durante las últimas décadas^{1,3,4}.

Entre los factores pronósticos de GBM, el estado de metilación del promotor del gen O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT) es el

más importante biomarcador de la respuesta a la quimioterapia alquilante utilizada en su tratamiento⁵. Aunque la media de supervivencia es de 14,6 meses con el tratamiento estándar, esta puede variar de 12,7 a 21,7 meses, dependiendo del estado de metilación del promotor de MGMT^{4,6}. El gen MGMT se localiza en la banda cromosómica 10q26 y expresa una enzima reparativa del ADN que remueve los grupos alquilo de la posición O⁶ de guanina, evitando así el mal apareamiento de bases y la muerte celular⁷. De esta forma, MGMT protege a la célula normal de la carcinogénesis y también del efecto letal de la quimioterapia con agentes alquilantes⁷.

La expresión de MGMT depende del estado de metilación de su promotor, el cual carece de elementos reguladores constitutivos y contiene una isla CpG que incluye 97 CpGs⁸. La metilación aberrante de las citocinas de estos dinucleótidos conduce al silenciamiento parcial o total del gen, expresado en la disminución o ausencia de la proteína MGMT, que explicaría la mayor susceptibilidad a la quimioterapia⁶. Sin embargo, actualmente no hay consenso en cuál es la técnica más apropiada para determinar el estado de metilación del promotor de MGMT en GBM⁹, considerado metilado en el 33-60% de los pacientes, dependiendo del estudio y del método utilizado¹⁰.

Pese al interés por su potencial rol en terapias personalizadas, el estudio del promotor de MGMT aún enfrenta limitaciones que impiden su uso rutinario¹¹. La reacción de polimerasa en cadena específica de metilación (MS-PCR) ha sido el método tradicionalmente utilizado para el estudio no cuantitativo de metilación del promotor de MGMT en ensayos clínicos⁹. Sin embargo, este método sólo interroga una proporción de las islas CpG y ha mostrado discordancias con métodos cuantitativos^{10,12,13}. Entre ellos destaca la secuenciación, que analiza el estado de metilación de cada CpG individualmente. Aunque este método ha mostrado buen rendimiento en estudios comparativos, se requiere aún mayor evidencia de su confiabilidad en estudios clínicos^{9,10}.

La inmunohistoquímica es un método rápido, de bajo costo y ampliamente disponible en laboratorios de neuropatología para el estudio de expresión de la enzima MGMT¹⁴. Sin embargo, su correlación con la respuesta al tratamiento y la metilación del promotor de MGMT sigue siendo controversial¹⁵⁻¹⁸. La heterogeneidad de los resul-

tados se ha atribuido principalmente a diferencias de diseño metodológico, incluyendo la ausencia de puntos de corte uniformes y el uso de métodos de exclusión de células no tumorales no uniformes^{16,17,19}. Sin embargo, el interés por esta técnica se ha revitalizado en los últimos años, a partir de evidencia reciente mostrando que el mejor valor pronóstico de MGMT se obtiene del estudio combinado tanto del promotor como de los niveles de expresión de MGMT mediante inmunohistoquímica^{10,20,21}. Esta evidencia en contra de la determinación aislada de la metilación del promotor se basa en el frecuente hallazgo de bajos niveles de expresión de MGMT en ausencia de metilación del promotor²⁰. Esto justifica implementar la técnica de tinción inmunohistoquímica para MGMT en nuestro medio, con miras a un futuro estudio combinado del comportamiento de MGMT como predictor de respuesta a quimioterapia.

El objetivo del presente estudio es determinar la frecuencia de la expresión de MGMT mediante estudio inmunohistoquímico en una muestra de pacientes con glioblastoma multiforme, diagnosticados y tratados en un centro de referencia nacional.

Material y Métodos

Muestra

Se seleccionó en forma retrospectiva una muestra por conveniencia de los últimos 30 casos de pacientes con diagnóstico histológico de GBM, estudiados y tratados durante los años 2013 y 2014 en el Instituto de Neurocirugía Dr. Alfonso Asenjo (INCA) de Santiago de Chile y que contaran con: 1) Informe neuropatológico confirmando el diagnóstico de GBM según los criterios de la OMS²; 2) tejido tumoral en calidad y cantidad suficiente para la tinción inmunohistoquímica; 3) información clínica de diagnóstico y seguimiento disponible. Para cada caso se dispuso de un taco de tejido tumoral fijado en formalina al 10% e incluido en parafina, obtenido en procedimientos quirúrgicos realizados en el INCA. La información clínica se obtuvo a partir de fichas clínicas del INCA y el registro de defunciones del Registro Civil de Chile.

Este estudio contó con la aprobación institucional y del Comité Ético-Científico del Servicio de Salud Metropolitano Oriente.

Tinción inmunohistoquímica

Se obtuvieron al menos 2 cortes de 5 µm de grosor para tinción inmunohistoquímica, luego de corroborar la presencia de tejido tumoral suficiente en cada taco mediante tinción de hematoxilina-eosina. El anticuerpo contra MGMT utilizado fue el anticuerpo monoclonal de ratón clon MT3.1 (ab39253, ABCAM). La tinción inmunohistoquímica se realizó siguiendo el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP kit [Peroxidase Universal], R.T.U. [Ready-to-Use], CA, USA), en base al protocolo publicado previamente¹⁴ como se resume a continuación: Desparafinación de las muestras en batería de alcoholes, seguido de la inactivación de peroxidasa endógenas en agua desionizada por 5 min; pretratamiento en tampón citrato al 0,1 M calentado a 90°C durante 20 min, para recuperación del antígeno objetivo; bloqueo de las uniones inespecíficas con suero normal de caballo del sistema de detección universal (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP kit) durante 30 min a temperatura ambiente; incubación de las muestras con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C; incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP kit) por 30 min, seguido del complejo avidina-biotina RTU LSAB (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP kit) durante 30 min a temperatura ambiente; revelado con diaminobencidina y peróxido de hidrogeno del *kit* de revelado de sustrato de peroxidasa DAB ImmPACT™ por 3 min; ligero contraste con hematoxilina de Mayer por 30 seg; deshidratación y aclarado en batería de alcoholes, y montaje.

Se realizó un test de dilución para definir la concentración de anticuerpo primario más adecuada. Se tiñeron cortes de 5 µm de 2 casos a diluciones crecientes (1: 200, 1: 100, 1: 50, 1: 25 y 1: 12,5) siguiendo el protocolo descrito (Figura 2). Además del control positivo interno (endotelio), se incluyó un control positivo externo (tejido hepático sano) y un control negativo de cada caso (Figura 1 A-C). La dilución de 1:25 mostró el mejor contraste entre núcleos teñidos y no teñidos, sin un aumento significativo de la tinción del fondo de la muestra (Figura 2).

Análisis de la tinción inmunohistoquímica

Para el análisis se escogieron cuatro campos (400x de aumento) de cada caso, a partir de dos secciones teñidas. Como la selección de los campos

a analizar, se consideró la alta celularidad y el buen contraste entre núcleos positivos y negativos para la tinción. En aquellos casos con escasos núcleos teñidos, se seleccionaron campos donde se distinguieran células endoteliales teñidas. Se excluyeron los campos cercanos a los bordes o pliegues de las muestras para evitar artefactos.

Se examinaron todas las células tumorales de cada campo utilizando una grilla de 3x3 para facilitar el análisis visual. En el conteo se excluyeron las células no tumorales que pueden expresar MGMT en forma normal, específicamente células endoteliales y linfocitos. Esta exclusión fue visual, basada en las características histológicas de estos tipos celulares. Solo se consideraron como células positivas para la tinción de MGMT aquellas con núcleos teñidos en forma homogénea y con una intensidad de tinción similar o mayor al endotelio. El porcentaje de células positivas utilizado como punto de corte para definir cada caso como positivo para la expresión de MGMT fue 10% del total de células contadas por caso. Este punto de corte se ha utilizado en la mayoría de los estudios previos¹⁷.

Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados en el programa STATA 14 (TX: StataCorp LP). Se obtuvieron estadígrafos de variables clínicas y demográficas; se realizó análisis de regresión lineal y prueba exacta de Fisher para estimar el efecto de variables de interés en el diagnóstico de expresión de MGMT.

Resultados

Antecedentes clínicos

Los principales antecedentes clínicos de los 30 casos seleccionados para el estudio se presentan en la Tabla 1. El promedio de edad al momento del diagnóstico fue de 54,8 años (rango 34-72 años) y 12 (40%) de los casos eran mujeres. La cefalea predominaba como síntomas de presentación, seguido por la aparición de un déficit motor focal y convulsiones. Respecto al tratamiento recibido, 15 pacientes fueron sometidos a cirugía resectiva parcial, 13 casos a cirugía resectiva total y en 2 casos se realizó una biopsia estereotáxica. Solo 10 casos recibieron radioterapia en algún momento de su evolución y solo 3 recibieron temozolamida. En términos de sobrevida, todos

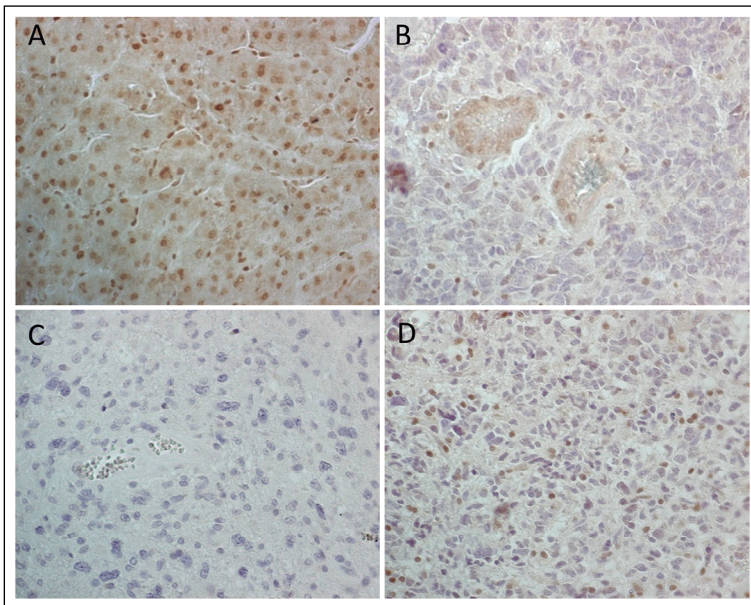


Figura 1. Estandarización de la tinción inmunohistoquímica para MGMT (400x). **A.** Control positivo externo (tejido hepático sano); **B.** Control positivo interno (endotelio); **C.** Control negativo (glioblastoma); **D.** Dilución 1:25 seleccionada para tinción y conteo.

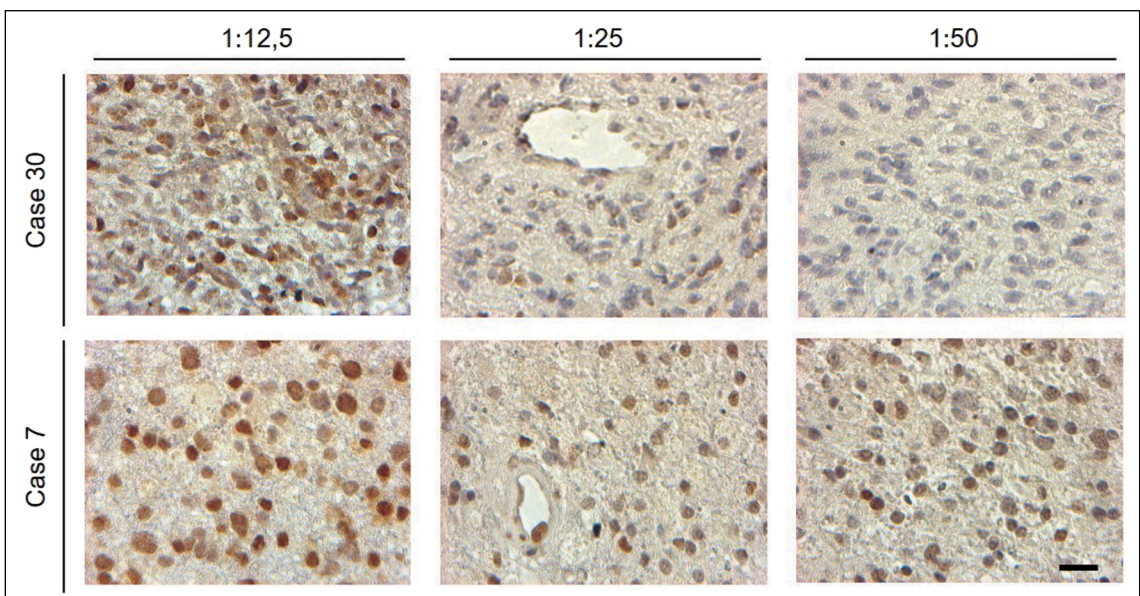


Figura 2. Test de dilución para definir concentración óptima del anticuerpo anti-MGMT (MT3.1, ab39253; Abcam) para la tinción inmunohistoquímica de MGMT. Se utilizó además ligero contraste con hematoxilina para visualizar aquellas células no teñidas para MGMT. Se muestran campos seleccionados (400x) de 3 de las 5 diluciones testeadas en dos casos seleccionados al azar. En ambos casos, la dilución de anticuerpo anti-MGMT de 1:25 resultó en la mejor calidad de tinción y contraste entre células teñidas y no teñidas para MGMT, sin un aumento significativo de la tinción de fondo.

los pacientes habían fallecido al momento de este estudio y la mediana de supervivencia global fue de 5,3 meses (rango 1 - 23 meses). Sin embargo, aquellos pacientes que recibieron quimioterapia

mostraron un mayor promedio de supervivencia global (13,1 meses; intervalo de confianza del 95% [IC 95%] 6,7 a 19,4 versus 6,9 meses, IC 95% 4,8 a 8,9; p-value < 0,001).

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de pacientes con GMB

Muestra (n = 30)	
A. Características generales	
Edad (años)	54,8* (Rango 33-74 años)
Evolución al diagnóstico (meses)	1,75** (RIC 0,68-3)
Hombres/Mujeres, %	56,7/43,3
Glioma previo, %	6,7
B. Manifestaciones clínicas	
<i>(i) Forma de presentación, %</i>	
Cefalea	40
Convulsiones	23,3
Déficit motor	23,3
Trastorno de la marcha	6,7
Alteración del lenguaje	6,7
Compromiso de conciencia	6,7
Alteraciones visuales	6,7
Hallazgo imagenológico	6,7
Deterioro cognitivo	3,3
<i>(ii) Examen Neurológico, %</i>	
Hemiparesia	40
Afasia	30
Normal	20
Síndrome confusional	20
Hemihipoestesia	10
Hemianopsia	6,7
Edema de papila	
C. Tratamiento recibido, %	
Cirugía	100
Resección parcial	50
Resección total	43
Biopsia estereotáxica	7
Radioterapia	33
Quimioterapia	10

*Promedio de edad en años. **Mediana en años, RIC: Rango intercuartílico.

Inmunohistoquímica para MGMT

La calidad de fijación de la muestra de un caso impidió su tinción y fue eliminado del análisis. Se examinó un total de 4 campos (400x) por caso, con una mediana de células contadas por caso de 692 (rango intercuartílico [RIC] 494-928). La Figura 3 muestra la distribución de células positivas y negativas para la tinción de MGMT y la clasificación de los casos estudiados. La proporción de células positivas para MGMT en cada caso varió en un rango de 0% a 71%, con una mediana de 10% (RIC 4-24%). En el caso de las células no teñidas

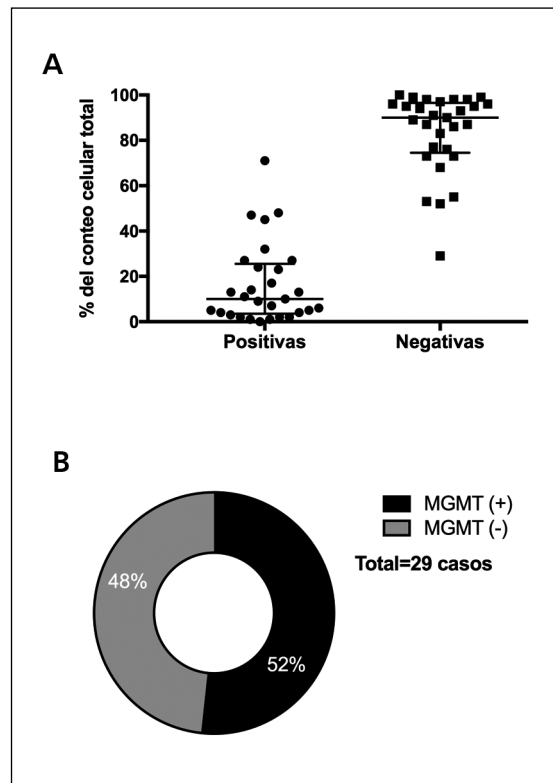


Figura 3. A. Gráfico de dispersión mostrando la distribución de los porcentajes de células con tinción positiva para MGMT o negativas para la tinción sobre el total de celular evaluadas en cada uno de los 29 casos analizados. Se indican mediana y rango intercuartílico para cada grupo. **B.** Diagnóstico de expresión de MGMT mediante estudio inmunohistoquímico utilizando el 10% de células positivas para la tinción como punto de corte.

el rango fue de 29% a 100%, con una mediana de 90% (RIC 76%-96%). Utilizando el punto de corte de 10% predefinido para este estudio, 15 (52%) casos se clasificaron como positivos para la expresión de MGMT. Al comparar los casos diagnosticados como positivos y negativos, no encontramos diferencias significativas en la edad (p -value = 0,2), sexo (p -value = 0,2) y tratamiento recibido entre ambos grupos (p -value = 0,6).

Discusión

Este estudio es el primero en evaluar la expresión de MGMT en GBM en un grupo de pacientes chilenos. Por ello, la implementación de un proto-

colo de tinción inmunohistoquímica para MGMT en nuestro laboratorio constituye un importante paso hacia la incorporación marcadores moleculares de respuesta a quimioterapia en el estudio de los pacientes con GBM. Bajo las condiciones experimentales descritas, obtuvimos una distribución de casos para la expresión de MGMT similar a la reportada en series internacionales, con 52% de los casos expresando MGMT en más de 10% de las células tumorales. Los grupos definidos de acuerdo a este criterio como positivos y negativos para la expresión de MGMT no mostraron diferencias significativas en sus antecedentes demográficos ni clínicos.

Aunque nuestros resultados son un avance en la caracterización molecular de los pacientes chilenos con GBM, la tinción inmunohistoquímica ha mostrado resultados dispares como predictor de respuesta a quimioterapia que limitan su uso aislado para el diseño de una terapia personalizada. La falta de criterios uniformes para la selección de campos de análisis y el uso de diferentes puntos de corte destacan como potenciales fuentes de variabilidad en el poder pronóstico de MGMT evaluado mediante esta técnica¹⁷. Los estudios difieren en el número de muestras y campos a analizar para cada caso. En nuestro estudio se escogió utilizar cuatro campos (400x) a partir de dos cortes no consecutivos, pero adyacentes a los cortes en que se corroboró el diagnóstico de GBM. Sin embargo, se ha documentado una significativa heterogeneidad en el fenotipo celular al interior de una misma masa tumoral²², que afectaría también la expresión de MGMT, aun en presencia de un estado de metilación del promotor MGMT homogéneo²³. Para la selección de los campos se aplicaron los criterios descritos en el método y una adaptación del algoritmo desarrollado por Preusser et al., que sistematiza una evaluación visual, tanto del tejido tumoral como de las células no tumorales que normalmente expresan MGMT¹⁶. Respecto al punto corte para considerar un caso como positivo para la expresión de MGMT, el rango va de 5% a 30%^{17,20}. La determinación de este punto es una limitante del método y continúa siendo en gran medida una decisión arbitraria¹⁷. Dado que no contamos con datos de respuesta a quimioterapia ni estudio del promotor para establecer un punto de corte óptimo, optamos por el valor de 10%, utilizado en la mayoría de los estudios previos¹⁷.

Menos atención como posibles fuentes de heterogeneidad en el análisis IHQ han recibido la dilución del anticuerpo utilizado y la intensidad de tinción como variable de análisis. En nuestro estudio decidimos realizar un test de dilución, dado el amplio rango de concentraciones utilizadas en los estudios previos, incluso para un mismo anticuerpo y fabricante. Aunque la dilución 1:25 permitió obtener un adecuado contraste entre núcleos positivos y negativos, la intensidad de la tinción no fue uniforme dentro de un mismo campo de análisis. Por este motivo, solo consideramos positivos aquellos núcleos con una intensidad igual o mayor a la del endotelio, utilizado como control positivo interno y tinción de referencia de tinción media. Sin embargo, pocos estudios reportan un criterio específico para aquellas células de tinción débil, pese a que existe evidencia de la importancia de expresiones mínimas en la respuesta a quimioterapia²⁴.

Los antecedentes demográficos y clínicos de nuestra muestra no difirieron de lo publicado en series internacionales y de datos nacionales previamente disponibles²⁵. Sin embargo, solo una minoría de los pacientes recibió quimioterapia alquilante, actualmente considerada parte del tratamiento estándar^{4,6}. Esta heterogeneidad en cuanto al tratamiento recibido nos impidió establecer el valor pronóstico del diagnóstico de expresión para MGMT y correlacionar nuestros resultados con la respuesta terapéutica en términos de supervivencia global. Finalmente, tampoco contamos con información del estado de metilación del promotor de MGMT, información que permitiría establecer una correlación con la inmunohistoquímica o un análisis combinado del comportamiento de MGMT, estrategia que ha mostrado ser el mejor predictor de la respuesta a quimioterapia^{10,20,21}.

El presente estudio constituye el primer intento por determinar la expresión de MGMT en pacientes chilenos con diagnóstico histopatológico de GBM utilizando un procedimiento estandarizado y fácilmente reproducible en los laboratorios de neuropatología de nuestro país. Sin embargo, se requieren nuevos estudios que correlacionen la metilación del promotor, la expresión de MGMT y la respuesta al tratamiento alquilante en nuestra población. La futura incorporación de la terapia alquilante al estándar de tratamiento del GBM en el sistema público de

salud requerirá del uso combinado de marcadores moleculares y de expresión de MGMT para establecer el pronóstico de respuesta terapéutica de manera personalizada.

Agradecimientos: Agradecemos el apoyo del Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile que financió este proyecto mediante fondo de investigación FIDECNO.

Referencias

- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* [Internet]. 2012; 14 Suppl 5: v1-49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23095881>
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2007 [cited 2014 Jan 21]; 114 (2): 97-109. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1929165&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of Gliomas. In: *Complications Surg* [Internet]. 2015. p. 1-14. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12048-5_1
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2009 May [cited 2013 Dec 11]; 10 (5): 459-66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269895>.
- Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, Bent MJ Van Den, Wick W, et al. REVIEWS MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* [Internet] 2010; 6 (1): 39-51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2009.197>
- Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* [Internet] 2005; 352 (10): 997-1003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758010>
- Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* [Internet]. 2000; 462 (2-3): 83-100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767620>
- Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, Zhao W, Higashimoto K, Satoh Y, et al. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene* [Internet]. 2003 [cited 2013 Dec 30]; 22 (55): 8835-44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647440>
- Thon N, Kreth S, Kreth FW. Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. Vol. 6, *OncoTargets and Therapy*. 2013. p. 1363-72.
- Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, Carpentier C, Labussière M, Lesimple T, et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 g. *Cancer* [Internet] 2012 [cited 2013 Dec 11]; 118 (17): 4201-11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22294349>.
- Dullea A, Marignol L. MGMT testing allows for personalised therapy in the temozolomide era. *Tumor Biol* 2016; 37(1): 87-96.
- Möllemann M, Wolter M, Felsberg J, Collins VP, Reifenberger G. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 2005; 113 (3): 379-85.
- Malley DS, Hamoudi RA, Kocalkowski S, Pearson DM, Collins VP, Ichimura K. A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma cells and xenografts. *Acta Neuropathol* 2011; 121(5): 651-61.
- Tortosa A, Viñolas N, Villà S, Verger E, Gil JM, Brell M, et al. Prognostic implication of clinical, radiologic, and pathologic features in patients with anaplastic gliomas. *Cancer* [Internet] 2003; 97 (4): 1063-71. Available from: <https://doi.org/10.1002/cncr.11120>
- Brell M, Ibáñez J, Tortosa A. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase protein expression by immunohistochemistry in brain and non-brain systemic tumours: systematic review and meta-analysis of correlation with methylation-specific polymerase chain reaction. *BMC Cancer* [Internet] 2011 Jan [cited 2014 Jan 21]; 11 (1): 35. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3039628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, Reifenberger G, Hamou M-F, Diserens A-C, et al. Anti-O6-methylguani-

- ne-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol* [Internet]. 2008 [cited 2013 Dec 26]; 18 (4): 520-32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400046>
17. Mason S, McDonald K. MGMT testing for glioma in clinical laboratories: discordance with methylation analyses prevents the implementation of routine immunohistochemistry. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2014 Jan 21]; 138 (11): 1789-97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986811>
 18. Tang K, Jin Q, Yan W, Zhang W, You G, Liu Y, et al. Clinical correlation of MGMT protein expression and promoter methylation in Chinese glioblastoma patients. *Med Oncol* [Internet] 2012 [cited 2013 Dec 26]; 29 (2): 1292-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394635>.
 19. Burke E, Grobler M, Elderfield K, Bond F, Crocker M, Taylor R, et al. Double-labelling immunohistochemistry for MGMT and a "cocktail" of non-tumourous elements is a reliable, quick and easy technique for inferring methylation status in glioblastomas and other primary brain tumours. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Jan 30]; 1 (1): 22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3893552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 20. Lalezari S, Chou AP, Tran A, Solís OE, Khanlou N, Chen W, et al. Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome. *Neuro Oncol* [Internet] 2013; 15 (3): 370-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328811>.
 21. Hsu C-Y, Ho H-L, Lin S-C, Chen M-H, Hsu SP-C, Yen Y-S, et al. Comparative Assessment of 4 Methods to Analyze MGMT Status in a Series of 121 Glioblastoma Patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet] 2016; 0 (0): 1-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27153440>.
 22. Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, Persano L, Puppa A Della, Frasson C, et al. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells* 2010; 28 (5): 851-62.
 23. Della Puppa A, Persano L, Masi G, Rampazzo E, Sinigaglia A, Pistollato F, et al. 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* 2012; 106 (1): 33-41.
 24. Miyazaki M, Nishihara H, Terasaka S, Kobayashi H, Yamaguchi S, Ito T, et al. Immunohistochemical evaluation of O(6)-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expression in 117 cases of glioblastoma. *Neuropathology* [Internet]. 2014 Jan 7 [cited 2014 Jan 21]; (November 2013). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24397721>.
 25. Quezada C, Segura R, Riquelme F, Z DR, Ayach F. Glioblastoma multiforme y estudio de la resistencia a la quimioterapia mediada por transportadores ABC 2011; 415-24.