

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“ESTUDIO DE LA EXPRESION DE MGMT (O⁶-METILGUANINA-DNA-
METILTRANSFERASA) EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA
MULTIFORME”**

DANIEL ANDRES JIMENEZ FERNANDEZ

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLOGICAS Y
MEDICAS
MENCION NEUROCIENCIAS**

Director de Tesis: Prof. Dr. Luis Cartier Roviroso

2016

Agradecimientos

A mi director de tesis, Dr. Luis Cartier Roviroso, por su guía y confianza en el trabajo desarrollado en esta tesis.

Al Dr. José Manuel Matamala, por su generoso y constante apoyo desde la concepción de esta investigación.

A la Sra. Carmen Vergara, por su paciencia y fundamental pedagogía en el trabajo de laboratorio.

Al equipo de colaboradores del Laboratorio de Investigación Biomédica del Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente, en especial al Dr. Rodrigo Fernández y a Alessandra Chiti (ayudante alumna).

Al Dr. Rómulo Melo y a la Dra. Claudia Tissera, por hacer partícipes de esta investigación al Departamento de Ciencias Neurológicas Oriente y al Laboratorio de Neuropatología del Instituto de Neurocirugía Asenjo, respectivamente.

A mis padres, por inspirar con su ejemplo y sabiduría cada paso caminado. A mis queridos hermanos, Juan Francisco y Evelyn, siempre a mi lado.

A Tamara, mi esposa y compañera, por su apoyo infinito y por saber recordarme el sentido de todo el esfuerzo puesto en este trabajo.

INDICE

1	RESUMEN.....	5
2	ABSTRACT	6
3	INTRODUCCION.....	7
3.1	Glioblastoma	7
3.1.1	Epidemiología.....	7
3.1.2	Diagnóstico histopatológico	8
3.1.3	Oncogénesis.....	9
3.2	O ⁶ -metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT)	11
3.2.1	Mecanismo de acción	12
3.2.2	Promotor de MGMT	12
3.2.3	Rol de MGMT en Glioblastoma.....	13
3.3	Métodos de evaluación de MGMT	14
3.3.1	Estudio de la metilación del promotor de MGMT	15
3.3.2	Estudio del nivel de expresión de la proteína MGMT	16
3.3.3	Estudio del nivel de expresión de ARN mensajero	19
3.3.4	Selección del método de estudio de MGMT	19
3.4	Definición del problema de investigación	22
4	HIPOTESIS.....	24
5	OBJETIVO GENERAL	24
	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
6	MATERIALES Y METODOS	25
6.1	Diseño del estudio.....	25
6.2	Sujetos	25
6.3	Muestras de tejido.....	25

6.4	Protocolo de tinción Hematoxilina Eosina	26
6.5	Inmunohistoquímica para análisis de la proteína MGMT	27
6.5.1	Estandarización de la técnica de tinción inmunohistoquímica para MGMT 29	
6.5.2	Método de cuantificación y análisis de la inmunohistoquímica para MGMT 31	
6.6	Obtención de datos clínicos	32
6.7	Análisis estadístico.....	32
6.8	Bioética	33
6.9	Recursos disponibles	33
7	RESULTADOS.....	35
7.1	Objetivo específico 1	35
7.2	Objetivo específico 2.....	36
7.3	Objetivo específico 3.....	37
8	DISCUSION.....	40
9	CONCLUSION.....	48
10	ANEXO (FIGURAS Y TABLAS)	49
11	BIBLIOGRAFIA.....	60

1 RESUMEN

Introducción: El Glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor primario más frecuente y maligno del SNC. Al tratamiento quirúrgico se agrega la quimioterapia con Temozolamida y el grado de beneficio que se obtiene con la quimioterapia depende del comportamiento de la O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT). El estudio de MGMT por inmunohistoquímica ha mostrado una correlación variable respecto de la respuesta al tratamiento, debido a la dispar interpretación de la intensidad de la tinción, constituyendo uno de los potenciales sesgos del método en la evaluación de resultados. **Objetivo general:** Incorporar la intensidad como una variable cuantitativa en el análisis del estudio inmunohistoquímico para MGMT en tejido tumoral de pacientes chilenos con diagnóstico de GBM. **Metodología:** Se utilizaron muestras de tejido tumoral de 30 pacientes con el diagnóstico de GBM procedentes del Instituto de Neurocirugía Asenjo. Separadamente se contabilizaron células con tinción fuerte, tinción media y débil, y se evaluó la importancia que tenía cada grupo en la evaluación total de la muestra. **Resultados:** Se obtuvieron resultados en 29 de los 30 casos estudiados. Se contó una mediana de células teñidas por caso de 692 (RIC 494-928). Al considerar sólo las células con tinción fuerte y media, resultaron positivos para una expresión significativa de MGMT 15 de los 29 casos, sin embargo al sumar las células con tinción débil se agregaron 11 casos negativos, que se reclasificaron como positivos. En esta serie la mediana de supervivencia global fue de 5,3 meses (RIC 3,4-12,8 meses) y sólo 3 de los pacientes habían recibido el tratamiento considerado estándar. **Discusión:** Si bien se logró establecer un método de tinción y conteo en que se consideró la intensidad como una variable cuantitativa, no fue posible correlacionar estos resultados con la respuesta a la quimioterapia, puesto que la mayoría de los pacientes estudiados no recibieron el tratamiento estándar.

2 ABSTRACT

Introduction: Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary malignant brain tumor. Treatment includes chemotherapy with Temozolomide and the magnitude of benefit depends on the behavior of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT). The study of MGMT by immunohistochemistry has shown a variable correlation with treatment response and a potential bias could be the disparate evaluation of the intensity of the nuclear staining. **Objective:** To incorporate the intensity as a quantitative variable in the analysis of immunohistochemical staining for MGMT in tumor tissue of Chilean patients with GBM. **Methodology:** Tumoral tissues of 30 patients from the Institute of Neurosurgery Asenjo were used. Cells with strong/medium and weak nuclear staining were counted separately and the weight of the last group in the overall evaluation of the sample was analyzed. **Results:** Results were obtained in 29 of the 30 cases. The median of cells counted per case was 692 (IQR 494-928). When considering only cells with strong/medium staining, 15 of the 29 cases were positive for the expression of MGMT, while by adding weak staining cells 11 negative cases were reclassified as positive. The median overall survival was 5.3 months (IQR 3.4 to 12.8 months) and only 3 patients received the standard treatment standard. **Discussion:** While it was possible to establish a method of staining and counting considering the intensity as a quantitative variable, it was not possible to correlate these results with measures of response to chemotherapy, since most patients evaluated did not receive the standard treatment.

3 INTRODUCCION

3.1 Glioblastoma

Los tumores primarios malignos del sistema nervioso central representan solo el 2% de todas las neoplasias de la economía. Sin embargo, su pobre pronóstico y limitadas alternativas terapéuticas le confieren una alta mortalidad y justifican el creciente interés en comprender su biología.

Los gliomas, derivados de astrocitos, oligodendrocitos o células ependimarias, representan más del 80 % de ellos y se dividen en cuatro grados de malignidad creciente.^{1,2} El astrocitoma grado IV o Glioblastoma (GBM) es el principal y más maligno tumor cerebral primario.¹ Su promedio de sobrevida alcanza sólo a los 14,6 meses, aún con el esquema de tratamiento estándar, y la sobrevida estimada a 5 años no supera el 5%.^{1,3}

3.1.1 Epidemiología

En USA, la incidencia anual de tumores primarios del sistema nervioso central es de 20,59 por 100.000 habitantes, y de 7,3 por 100.000 habitantes en el caso de los tumores malignos. Entre la amplia variedad de tumores primarios destaca el grupo de los gliomas, que representan el 31% de todos los tumores cerebrales y el 81% de los tumores cerebrales malignos. De ellos, el GBM es el subtipo más frecuente (54%).¹

La incidencia global de GBM es de 3,19 por 100.000 habitantes/año y es 1,6 veces más común en hombres que en mujeres. Cabe señalar que la incidencia aumenta notablemente con la edad, siendo máxima entre los 75 y 84 años.¹

En Chile, las neoplasias corresponden a la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares, representando el 25,6% de las defunciones.⁴ La tasa de mortalidad por cáncer cerebral es de 1,35 por 100.000 habitantes y su tendencia es al aumento en ambos sexos durante las últimas décadas.⁵ En cuanto al GBM, el registro de pacientes diagnosticados en el Instituto de Neurocirugía Asenjo (INCA) entre los años 2007 y 2009 muestra una tasa de mortalidad cercana al 90%, con una mediana de supervivencia de 6 meses.⁶ No se dispone de datos de incidencia de cáncer cerebral y sus subtipos en nuestra población.

3.1.2 Diagnóstico histopatológico

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los tumores cerebrales primarios en base a su origen celular e histología.² El primer sistema de graduación de la OMS data del año 1993. Esta fue revisada el año 2000 y actualizada por última vez el 2007.^{2,7} Este sistema de graduación busca estratificar la malignidad de los tumores del sistema nervioso central en cuatro grados de malignidad creciente. De esta manera, los tumores que sólo presentan atipia celular son considerados grado 2, aquellos donde además hay mitosis son grado 3, mientras que los tumores que muestran atipia, mitosis, proliferación endotelial o necrosis son grado 4.⁸

El GBM es clasificado como grado IV en el sistema de la OMS y se caracteriza por necrosis y marcado incremento en la celularidad y el pleomorfismo. Cabe señalar que la clasificación WHO permite un diagnóstico de grado IV en base a proliferación vascular sin el hallazgo definitivo de necrosis.² Además, en la última actualización se reconocen nuevas entidades histopatológicas considerados patrones divergentes de glioblastoma.² Tal es el caso del glioblastoma de células pequeñas, en el que este tipo de célula predomina o es exclusivo, y el glioblastoma con componente oligodendroglial en el que, como su nombre lo señala, hay focos variables que semejan al oligodendroglioma.²

3.1.3 Oncogénesis

Los gliomas o tumores neurogliales representan un grupo heterogéneo de tumores cerebrales originados a partir de células gliales. El glioblastoma corresponde al subtipo histológico de mayor malignidad (OMS grado IV). Se presenta frecuentemente de novo, aunque un pequeño grupo se origina a partir de gliomas de bajo grado.⁹ La acumulación de alteraciones somáticas y hereditarias en genes que controlan procesos biológicos críticos como el crecimiento celular, la angiogénesis y la apoptosis, permite la progresiva transformación y supervivencia de una población celular anormal que constituirá el tumor.^{10,11}

En las últimas décadas se han descrito importantes aspectos de la patogenia del glioblastoma relacionados con alteraciones genéticas. Destacan principalmente la desregulación de la señalización de factores de crecimiento vía amplificación y

activación mutacional de los genes del receptor tirosina kinasa (RTK), la activación de la vía del fosfatidil inositol 3-kinasa (PI3K) y la inactivación de la vía de supresión tumoral de p53 y retinoblastoma.¹² El TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network) ha expandido el conocimiento de las bases moleculares del cáncer. A partir del estudio de 601 genes en una cohorte de 206 pacientes, se estableció que la mayoría de los glioblastomas presentan anomalías en estas tres vías de señalización celular, sugiriendo que este es el núcleo fundamental en la patogénesis del GBM.¹³ No obstante lo anterior, cada tumor presenta un perfil de expresión génica único, incluso dentro de un mismo grado tumoral. Esta heterogeneidad ha llevado a plantear una nueva clasificación, basada en perfiles de expresión génica.¹⁴

Además de los mecanismos genéticos, las alteraciones epigenéticas participan de la regulación de la expresión de genes en el cáncer. La epigenética puede ser definida como cambios en la expresión génica mitóticamente heredables que no son debidos a cambios en la secuencia primaria del ADN.¹⁵ Entre los principales mecanismos de regulación epigenética destacan las modificaciones covalentes del DNA y aminoácidos de las histonas.¹⁵ Las principales alteraciones epigenéticas en glioblastoma son la hipometilación global del ADN, la hipermetilación locus específica de islas CpG en los promotores de genes con diversas funciones relacionadas con la tumorigénesis y la progresión tumoral y el silenciamiento epigenético de genes implicados en la resistencia al tratamiento con agentes alquilantes.¹⁵

3.2 O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT)

La metilación del promotor de O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT) es uno de los biomarcadores que mayor interés ha concitado en el estudio de la respuesta a los agentes alquilantes utilizados como quimioterapia estándar en glioblastoma.

El gen MGMT se localiza en la banda cromosómica 10q26 y expresa una enzima reparativa del ADN cuyo nivel de expresión varía entre órganos.¹⁶ Existe gran variación en la expresión y actividad de MGMT en los diferentes tejidos normales y gran variabilidad interindividual para un mismo tejido. En una reciente revisión de la evidencia disponible, la mayor actividad de MGMT se presenta consistentemente en el tejido hepático, mientras que la menor se presenta en el cerebro.¹⁷

En general, los tumores exhiben altos niveles respecto a sus tejidos de origen.¹⁸ Los datos disponibles muestran que la expresión es alta en los tumores de hígado, colon y ovario, y baja en los tumores cerebrales.¹⁷ Asimismo, dentro de los tumores cerebrales también existe heterogeneidad, siendo los gliomas tumores de menor actividad de MGMT respecto de los no-gliomas.¹⁷

3.2.1 Mecanismo de acción

Esta enzima reparativa remueve los grupos alquilo de la posición O⁶ de guanina, transfiriendo el grupo alquilo al sitio activo de la propia enzima.¹⁹ La presencia de O⁶-alquilguanina condiciona un incorrecto apareamiento de bases y quiebres de la doble hebra, induciendo apoptosis y muerte celular. Por lo tanto, la actividad reparativa de MGMT protege a la célula normal de la carcinogénesis.²⁰ Sin embargo, O⁶-alquilguanina es también uno de los productos citotóxicos inducidos por los agentes alquilantes, y es por esta razón que MGMT también protege a la célula del efecto letal de la quimioterapia con este tipo de agentes.¹⁹

3.2.2 Promotor de MGMT

El promotor de MGMT carece de elementos reguladores constitutivos (TATA y CAT box) y contiene una isla CpG.²¹ Las islas CpG son regiones genómicas de 300 a 3000 pb, que contienen una alta frecuencia de dinucleótidos CG y habitualmente se localizan en la vecindad del sitio de inicio transcripcional.¹⁶ La región de máxima actividad del promotor de MGMT reside en el extremo 5' del gen (desde -953 a +202; sitio de inicio de transcripción +1 pb) y la isla CpG (pb -552 a +289) incluye 97 CpGs, que usualmente no están metilados en tejidos normales.²¹ La metilación aberrante de la citocina de estos dinucleótidos lleva a su unión con proteínas de unión metil-CpG, produciendo alteraciones en la estructura de la cromatina que la llevan a condensarse en forma de heterocromatina, condición que la hace inaccesible para los factores de transcripción.²¹⁻²³ Esta inactivación de la transcripción lleva al

silenciamiento parcial o total del gen expresada en la disminución o ausencia de la proteína MGMT.^{21,24}

3.2.3 Rol de MGMT en Glioblastoma

Los primeros antecedentes del rol de la proteína MGMT en gliomas de alto grado derivan de la observación de una mejor respuesta al tratamiento con carmustina en pacientes con bajos niveles de MGMT, estimados en forma retrospectiva mediante inmunofluorescencia.²⁵ Poco después surgen los primeros datos de una mayor sobrevida en pacientes con diagnóstico de glioblastoma o astrocitoma anaplásico tratados con temozolamida como terapia inicial o neoadyuvante, cuyos niveles de proteína MGMT detectada por inmunohistoquímica eran bajos.²⁶

El estudio EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) evaluó el beneficio de la terapia combinada de radioterapia más temozolamida versus radioterapia estándar en una numerosa cohorte prospectiva. Tras 5 años de seguimiento, sus resultados demostraron el beneficio de asociar temozolamida como terapia concomitante y adyuvante al tratamiento estándar.³ En un subgrupo representativo de esta muestra se evaluó el estado de metilación del promotor del gen MGMT en forma retrospectiva. De todas las variables clínicas y de laboratorio estudiadas, el estado de metilación del promotor de MGMT fue el predictor de sobrevida más potente. Si bien el beneficio de la terapia combinada fue significativo para todos los pacientes, un análisis de sobrevida libre de progresión

mostro una ventaja para aquellos cuyo promotor de MGMT estaba metilado (23,4 meses de sobrevida promedio) respecto a aquellos en quienes no estaba metilado (12,6 meses de sobrevida promedio).³

Desde que el estudio EORCT demostró un mayor beneficio de la terapia alquilante en aquellos pacientes cuyo promotor de MGMT se encuentra metilado, se ha asignado un valor pronóstico de respuesta al tratamiento con temozolamida al estado de metilación del promotor. Por este motivo, su estudio se ha utilizado para estratificar sujetos participantes en múltiples ensayos clínicos fase II y III. Sin embargo, dado que el beneficio no desaparece en aquellos sujetos con promotor no metilado, no hay evidencia que respalde no utilizar quimioterapia alquilante en este grupo de pacientes. Por este motivo, el estudio del estado de MGMT no ha sido incorporado al protocolo de estudio y manejo de glioblastoma.²⁷

Pese a esto, el comportamiento de MGMT se ha convertido en un importante foco de atención para la búsqueda de factores pronósticos y de respuesta a nuevos esquemas de tratamientos, así como un biomarcador relevante al momento de diseñar terapias personalizadas en subgrupos particulares de pacientes.^{16,27}

3.3 Métodos de evaluación de MGMT

El comportamiento de MGMT en glioblastoma puede estudiarse fundamentalmente a partir de ADN, ARN o del nivel de expresión proteica.^{28,29} Todos estos métodos se realizan a partir de tejido tumoral obtenido por procedimientos

neuroquirúrgicos. A continuación se revisan los aspectos más relevantes de las principales técnicas utilizadas para evaluar el comportamiento de MGMT en glioblastoma.

3.3.1 Estudio de la metilación del promotor de MGMT

El promotor de MGMT se ha considerado metilado en el 33-60% de los pacientes, dependiendo del estudio y del método utilizado.^{29,30} Actualmente no hay consenso en cuál es la técnica más apropiada para determinar el estado de metilación del promotor de MGMT.²⁷

En general, los métodos utilizados para estimar el estado de metilación del promotor de MGMT lo hacen interrogando sólo una fracción de las CpGs. Todos requieren como primer paso la conversión bisulfito del ADN, que resulta en la conversión de la citocina no metilada en uracil, que es reemplazada por timidina mediante PCR. Al contrario, la metilcitocina no será convertida y se mantendrá como citocina. Para el paso siguiente se han desarrollado métodos no cuantitativos, cuantitativos y semicuantitativos.¹⁶

El estudio EORCT en particular, utilizó la reacción en cadena de polimerasa metilación específica (MS-PCR), método no cuantitativo binario que clasificó los pacientes en metilados y no metilados.³ Un meta análisis reciente que incluyó a 2986 pacientes de 30 estudios, concluyó que la metilación del promotor de MGMT, evaluada por MS-PCR, se asoció a mejor supervivencia global y libre de progresión

independiente del tratamiento, y a mejor sobrevida global en aquellos pacientes con glioblastoma tratados con agentes alquilantes.³¹ Aunque este método es el más utilizado, se ha sugerido que la región del promotor que interroga puede no ser la que mejor se correlaciona con la actividad transcripcional.³² En los últimos años se han desarrollado métodos semi cuantitativo o cuantitativos, como COBRA, BiSEQ, MSP MethylLight y la pirosecuenciación, técnicas que aún no han demostrado ser superiores en estudios de tal magnitud.^{33,34}

3.3.2 Estudio del nivel de expresión de la proteína MGMT

El método más utilizado para estudiar el nivel de expresión de la proteína MGMT es la inmunohistoquímica. En comparación con los métodos que estudian la metilación del promotor, la inmunohistoquímica es una técnica ampliamente disponible en laboratorios de neuropatología, dado su extenso uso en estudios histopatológicos y menor costo.³³

Sin embargo, la correlación entre la expresión de MGMT y la metilación del promotor, tanto para tumores cerebrales como para otras neoplasias, continúa siendo controversial.³³⁻³⁶ Un reciente meta análisis de 52 estudios que incluían tumores cerebrales y de otras localizaciones analizó la correlación entre metilación del promotor de MGMT por MS-PCR y nivel de expresión evaluada mediante inmunohistoquímica. Sus resultados mostraron que ambos métodos no son intercambiables porque la concordancia entre ellos no es buena.³³

Por otra parte, aunque el efecto en la respuesta a los agentes alquilante se atribuye a la actividad directa de la proteína MGMT, el valor pronóstico de su presencia evaluada por inmunohistoquímica tampoco ha sido consistente entre los diversos estudios.^{33,34,37,38} En una revisión de 22 trabajos, 8 estudios mostraron que la IHQ predecía significativamente la sobrevida, mientras que en otros 6 no existía una buena correlación.³⁸

Esta notoria disparidad en los resultados se ha atribuido principalmente a diferencias de diseño entre los estudios y a la heterogeneidad en los métodos de análisis de la inmunohistoquímica. Entre las principales fuentes de heterogeneidad destacan el bajo número de casos analizados en la mayor parte de los estudios, la alta variabilidad inter observador, el uso de puntos de corte heterogéneos para definir alto/bajo nivel de expresión y de métodos de conteo sin sistemas de exclusión de células no tumorales estandarizados.^{29,39} También se han detectado diferencias en los resultados de acuerdo al anticuerpo utilizado en la inmunohistoquímica, pero los datos son aún insuficientes.^{33,37,38} Cabe destacar que de los 22 estudios revisados al año 2012, todos excepto 3 utilizaron el anticuerpo monoclonal murino MT3.1.³⁸

Estas discordancias y limitaciones metodológicas hicieron considerar que la inmunohistoquímica no era un método confiable para ser utilizado como biomarcador.^{33,37} Sin embargo, los resultados de una serie de estudios que han intentado corregir sus problemas metodológicos, han vuelto a despertar el interés en esta técnica como alternativa para la evaluación de MGMT.⁴⁰

Respecto al método de conteo, cabe señalar que la proteína MGMT se localiza en el núcleo celular y por lo tanto la positividad se determina por el porcentaje de núcleos teñidos sobre el total de núcleos de la muestra. Se ha estandarizado un método de conteo que permite la estimación del porcentaje de células inmunoteñidas, con particular atención a la exclusión de células no tumorales teñidas, incluyendo células endoteliales, macrófagos y tejido cerebral que normalmente expresan MGMT.^{34,35,41} Para evitar la sobrestimación del porcentaje de núcleos positivos debido a la inclusión de células MGMT positivas no tumorales, algunos estudios han utilizado anticuerpos contra CD3 para distinguir linfocitos, GFAP para astrocitos, CD68 para macrófagos y factor VII o CD31 para células endoteliales de vasos capilares, entre otros.^{35,41,42} Si bien no se ha llegado a uniformar el procedimiento, recientemente se ha propuesto un protocolo de doble etiquetado para MGMT y un “cocktail” de marcadores para células no tumorales compuesto por anticuerpos contra CD34, CD45 y CD48 para diferenciar endotelio, linfocitos y macrófagos respectivamente. Este protocolo ha mostrado ser un procedimiento de más fácil visualización y cuya correlación con el estado de metilación del promotor es superior al método estándar.³⁹

En relación al punto de corte para considerar alto o bajo el nivel de expresión, el porcentaje varía del 5 al 50% entre los distintos estudios.^{29,34,38,39,43} Aunque se han propuesto métodos de estratificación en varios niveles, el uso de un punto de corte

basado en la mediana de expresión ha mostrado ser una herramienta suficiente para separar dos grupos de comportamiento significativamente distinto.^{32,34,39}

3.3.3 Estudio del nivel de expresión de ARN mensajero

El patrón de expresión de ARN mensajero (ARNm) también ha mostrado discordancias con la metilación del promotor. Si bien existe una significativa correlación entre el estado de metilación del promotor y el nivel de expresión de ARNm, las discordancias alcanzan hasta el 25% de los casos estudiados.²⁰ Lo más destacable es que los pacientes con baja actividad transcripcional exhiben mejor respuesta a tratamiento, aún cuando el promotor no está metilado.²⁰ De tal forma que la regulación diferencial del ARNm puede ayudar a comprender por qué la metilación del promotor de MGMT no está inequívocamente ligada a una respuesta favorable al tratamiento.²⁷ Por su parte, la correlación entre ARNm y el nivel de proteína medida por inmunohistoquímica o Western Blot no es buena, sugiriendo la existencia de un sistema de regulación post transcripcional de MGMT.⁴⁴

3.3.4 Selección del método de estudio de MGMT

Actualmente no existe un consenso acerca de cuál es el mejor método para evaluar el estado de MGMT en glioblastoma. En un análisis comparativo de cinco métodos la pirosecuenciación mostró el mejor valor predictivo de supervivencia global y libre de progresión.²⁹ Por su parte, en este mismo estudio y en una gran cohorte estudiada por Lalezari et al. en 2013, la inmunohistoquímica por sí sola mostró

significativa correlación con la sobrevida de los pacientes sometidos a quimioterapia alquilante.³⁴ Sin embargo, la combinación del análisis del estado de metilación del promotor con el estudio de expresión proteica por inmunohistoquímica logra el mayor poder predictivo.^{29,34}

En el estudio de Lalezari et al, se establece una buena correlación entre un alto nivel de expresión de MGMT y la no metilación del promotor de MGMT. Por el contrario, cuando el nivel de expresión medido por IHQ es bajo no existe buena concordancia con el estado de metilación del promotor. Esto se refleja en que el 44% de los tumores con baja expresión no tienen el promotor metilado.³⁴

Del punto de vista pronóstico, los pacientes con alta expresión de MGMT muestran una peor sobrevida independiente del estado de metilación del promotor, mientras que en el caso de aquellos con baja expresión, sólo el 56% cuyo promotor está metilado tiene un mejor pronóstico.³⁴ En otras palabras, el grupo de pacientes que muestra mejor sobrevida es aquel en el que además de un bajo nivel proteico se constata la metilación del promotor.³⁴

Una posible explicación para los casos con baja expresión de MGMT pese a que el promotor no está metilado, es que la expresión de MGMT sea inducible. Se ha descrito que tanto los glucocorticoides como la radio y quimioterapia pueden inducir la expresión de MGMT.³³ Otra explicación propuesta para estas discordancias es la modulación del nivel proteico por sustrato.⁴⁵ En la mayoría de las células humanas el

nivel de proteína MGMT es proporcional a la cantidad de ARNm. Sin embargo, cuando MGMT interactúa con sus sustratos sufre cambios conformacionales que la llevan a la degradación, sin una velocidad de regeneración suficiente. Esto lleva a una drástica caída de sus niveles manteniendo niveles altos de ARNm.⁴⁶ Sin embargo, los casos estudiados por Lalezari no habían sido previamente expuestos a los inductores descritos ni a sustratos exógenos.³⁴

Por todo esto, aún no es claro el origen de la heterogeneidad del grupo considerado negativo por el método de Lalezari. Este grupo sería el responsable de la mala correlación entre metilación e IHQ observada en los estudios previos e impediría su uso como método único.³⁴ Tanto estos resultados como los de Quillien 2012 avalan un estudio combinado, donde la IHQ puede ser un buen método preliminar para identificar aquellos casos de alta expresión, mientras que se requerirá evaluar el estado de metilación del promotor en aquellos casos que muestran baja expresión proteica para predecir la magnitud de la respuesta al tratamiento alquilante.^{29,33,34}

Sin embargo, también existen propuestas para mejorar la precisión del método de análisis de la inmunohistoquímica para MGMT, y así definir grupos de comportamiento más homogéneo. Una observación importante es que la mayor parte de los estudios publicados no discriminan entre las distintas intensidades de tinción nuclear.⁴⁷ Sin embargo, a principios de 2014 ha sido publicado un estudio japonés que por primera vez utiliza un score cuantitativo que considera tanto proporción de

núcleos teñidos como la intensidad de la tinción. En este estudio una mínima expresión de MGMT fue el predictor independiente de supervivencia más potente en pacientes tratados con terapia alquilante.⁴⁸ Cabe destacar que en este estudio no se evaluó el estado de metilación del promotor ni tampoco se comparó el resultado del análisis cuantitativo propuesto con el método de análisis convencional utilizado por Lalezari.

3.4 Definición del problema de investigación

En síntesis, aunque todos los pacientes con glioblastoma multiforme se benefician de la quimioterapia con temozolamida, existen diferencias significativas en el pronóstico de acuerdo al comportamiento del gen MGMT. El estudio de la metilación de su promotor por MS-PCR es el método más utilizado en investigación, pero su acceso es limitado. La inmunohistoquímica de MGMT, alternativa de bajo costo y amplio acceso, ha vuelto a considerarse como una posible herramienta para predecir la respuesta al tratamiento alquilante. La optimización de este método permitirá contar con un factor pronóstico de especial relevancia en países como el nuestro, donde la quimioterapia con temozolamida aún no se administra a todos los pacientes con glioblastoma. En este contexto, un método de evaluación que incorpore la intensidad como variable cuantitativa permitiría identificar casos de expresión de MGMT mínima pero suficiente para predecir una peor respuesta al tratamiento. De esta forma, sería posible entonces que parte de los pacientes considerados como negativos para la expresión de MGMT por el método de Lalezari 2013, sean catalogados como positivos por este nuevo método. Si bien el método

propuesto por Miyazaki en 2014 tiene el valor de haber incorporado la intensidad como criterio de evaluación, su principal problema es que se basa en una impresión global de la intensidad de la muestra y no evalúa la intensidad de tinción de cada núcleo de la muestra.

4 HIPOTESIS

La incorporación de la intensidad de tinción nuclear como una variable cuantitativa en el análisis de la tinción inmunohistoquímica para MGMT, permite una mejor estimación de su nivel de expresión y una mejor correlación con la respuesta al tratamiento alquilante

5 OBJETIVO GENERAL

Incorporar la intensidad como una variable cuantitativa en el análisis de la tinción inmunohistoquímica para MGMT en tejido tumoral de pacientes chilenos con diagnóstico de glioblastoma multiforme.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el nivel de expresión de MGMT en tejido tumoral de pacientes chilenos con diagnóstico de glioblastoma multiforme.
2. Estimar el efecto de la variable cuantitativa de intensidad en el análisis del nivel de expresión de MGMT mediante inmunohistoquímica.
3. Correlacionar el nivel de expresión de MGMT con los antecedentes clínicos de los pacientes con glioblastoma multiforme.

6 MATERIALES Y METODOS

6.1 Diseño del estudio

Corresponde a un estudio observacional descriptivo transversal.

6.2 Sujetos

En este estudio se utilizaron tejidos y datos clínicos de sujetos con diagnóstico histológico de Glioblastoma multiforme. Se seleccionarán en forma retrospectiva 30 casos estudiados y diagnosticados en el Instituto de Neurocirugía Asenjo (INCA). Se consideraron como criterios de selección los siguientes:

- 1) Muestras de tejido en cantidad y calidad para el estudio inmunohistoquímico
- 2) Datos clínicos y de seguimiento suficientes para realizar una buena correlación

6.3 Muestras de tejido

De cada sujeto 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. Todos los casos cuentan con informe neuropatológico que confirma el diagnóstico de glioblastoma multiforme según los criterios de la OMS.²

A partir de los tacos seleccionados, se obtuvieron cortes para tinción de hematoxilina-eosina con el objetivo de corroborar la presencia de tejido tumoral que cumpliera los criterios de la OMS para glioblastoma multiforme, previo a la tinción de

inmunohistoquímica para MGMT. En aquellos casos en que la presencia de tejido tumoral fue escasa o nula, se volvió a cortar y teñir hasta obtener una adecuada proporción de tumor.

La tinción para MGMT se realizó a partir de los mismos bloques de tejido utilizados para verificar la presencia de tejido tumoral.

6.4 Protocolo de tinción Hematoxilina Eosina

A continuación se expone el protocolo utilizado en nuestro laboratorio para la tinción hematoxilina eosina.

Las soluciones y reactivos a utilizar son:

- 1% Ácido solución de alcohol (para la diferenciación): Acido clorhídrico 1 ml/
Etanol 70% 100 ml
- 0.2% solución de agua de amoníaco (azulado): Hidróxido de amonio (concentrado) 2 ml/ Agua destilada 1000 ml
- Carbonato de litio de la solución (saturada): Carbonato de litio 1,54 g/ Agua destilada 100 ml
- Eosina Solución de archivo: Eosina Y 1 gr/ Agua destilada 100ml
- Solución de hematoxilina (Harris): Potasio o amonio (alumbre) 100 gr/ Agua destilada 1000 ml

Se calienta hasta disolver. Luego se añade 50 ml de solución de hematoxilina alcohólica al 10% y se calienta a ebullición durante 1 minuto. Se retira del fuego y se agrega lentamente 2,5 g de óxido de mercurio (rojo) hasta que la solución tome un

color púrpura oscuro. Se enfría la solución en baño de agua fría y se añaden 20 ml de ácido acético glacial (concentrado). Filtrar antes de su uso.

Los pasos del procedimiento de tinción se exponen secuencialmente:

Desparafinar, 2 cambios de xilol de 10 minutos cada uno; Re-hidratar en 2 cambios de alcohol absoluto de 5 minutos cada uno; 95% de alcohol durante 2 minutos y 70% de alcohol durante 2 minutos; Lavar brevemente en agua destilada; Teñir en solución de hematoxilina de Harris durante 5 minutos; Lavar en agua corriente durante 5 minutos; Diferenciar en alcohol ácido al 1% durante 30 segundos; Lavar con agua de la llave durante 1 minuto; azulado en el 0,2% del agua de amoníaco o una solución de carbonato de litio durante 30 segundos a 1 minuto saturado; Lavar en agua corriente durante 5 minutos; Enjuagar con alcohol al 95%, 10 inmersiones; Contrastar en solución de eosina durante 1 minuto; Deshidratar a través de 95% de alcohol, 2 cambios de alcohol absoluto, 5 minutos cada uno; Aclarar en 2 cambios de xileno, 5 minutos cada uno; Montaje con medio de montaje permount.

6.5 Inmunohistoquímica para análisis de la proteína MGMT

La tinción inmunohistoquímica de MGMT se realizó en grupos de 5 casos. Se incubaron dos cortes de 5 μ m de cada taco seleccionado con el anticuerpo monoclonal de ratón clon MT3.1., siguiendo el protocolo descrito por Lalezari et al, 2013 que se describe a continuación:

- Se desparafinan los cortes en xileno por 30 minutos y posterior paso por batería de alcoholes de concentraciones decrecientes, seguido por agua desionizada por 5 minutos.
- Las muestras se pre-tratan con tampón citrato al 0.1 M calentado a 90°C durante 20 minutos, para recuperación del antígeno objetivo, y luego enjuagadas en solución salina tamponada con Tris (TBS) al 0,1%.
- Bloqueo de las uniones inespecíficas con suero normal de caballo (botella 1 del kit Sistema de detección universal VECTASTAIN® Elite kit) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- El siguiente paso consiste en la incubación de las muestras con el anticuerpo primario en la dilución a utilizar, durante toda la noche a 4°C
- Tras la incubación con el anticuerpo primario, y tras lavar en solución TBS, se procede a la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (botella 2 kit VECTASTAIN®) con 1 gota que cubra el tejido durante 30 minutos.
- Luego del lavar en solución TBS se aplica 1 gota del complejo avidina-biotina (botella 3 del kit VECTASTAIN® RTU LSAB) durante 30 min a temperatura ambiente y posterior enjuague en solución TBS.
- Revelado con diaminobencidina y peróxido de hidrogeno del Kit de revelado ImmPACT DAB Peroxidasas por 3 minutos y luego lavado en agua corriente.
- Finalmente se aplica un ligero contraste con hematoxilina de Mayer por 30 segundos.

- El último paso consiste en deshidratar y aclarar en batería de alcoholes (Alcohol 95% 1 baño; Alcohol 100% 2 baños y Xilol 2 baños), para finalmente montar con medio de montaje.

6.5.1 Estandarización de la técnica de tinción inmunohistoquímica para MGMT

En Chile, la técnica de tinción inmunohistoquímica para MGMT en muestras de glioblastoma no ha sido estandarizada. Por este motivo, se realizó la estandarización de un protocolo de tinción inmunohistoquímica utilizando el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa (DAKO LSAB2 System, Peroxydase; DAKO, Carpintería, CA, EUA), en base al protocolo previamente publicado por Tortosa 2003. Se utilizó como control positivo muestra de tejido hepático. Tanto las muestras de tejido tumoral como de tejido hepático utilizadas se obtuvieron a partir de tacos de biopsia incluidos en parafina. El anticuerpo contra MGMT usado fue el anticuerpo monoclonal de ratón clon MT3.1 (ABCAM), anticuerpo utilizado en la mayor parte de los estudios previos.

La primera tinción incluyó secciones de 5 μm obtenidas a partir de muestras de tejido hepático sano, considerado control positivo por la alta expresión de MGMT en condiciones normales, y dos secciones de 5 μm de tejido tumoral por caso de cinco casos elegidos al azar, previa confirmación del diagnóstico histopatológico de glioblastoma multiforme. En estos casos se consideró la tinción de las células endoteliales como control positivo interno, dado que expresan MGMT en condiciones normales. Asimismo, dos secciones de dos casos distintos elegidos al azar su

utilizaron como control negativo. La dilución de anticuerpo primario utilizada fue 1:100, de acuerdo a la recomendación del fabricante. En el caso de los controles negativos no se incubó el anticuerpo primario, pero si se trató con el anticuerpo secundario del Kit de tinción. El protocolo de tinción de las secciones de tejido tumoral incluyó tinción con hematoxilina, con el objetivo de poder visualizar y contar los núcleos no captantes de anticuerpo. En la figura 1 se muestran fotografías de campos 400x de los controles positivos y negativos obtenidos de esta primera tinción. (ver anexo)

El rango de dilución del anticuerpo MT3.1 utilizado en los diferentes estudios va de 1:20 a 1:100. Por este motivo, se seleccionaron dos de los primeros cinco casos teñidos para la estandarización de la dilución del anticuerpo anti MGMT. Se eligió un caso con abundantes núcleos teñidos para MGMT y otro con escasos núcleos teñidos. Se seleccionó una sección de 5 μm de cada caso para cada una de las siguientes diluciones: 1:200, 1:100, 1:50, 1: 25 y 1:12,5. Además se utilizó un par como control negativo. Al final de la tinción y en todos los casos, se utilizó hematoxilina para evidenciar los núcleos que no captan el anticuerpo en estudio. Las fotografías de los campos 400x seleccionados de cada una de las secciones teñidas se muestran en la figura 2. (ver anexo)

En base a estos resultados se estableció la dilución de 1:25 como óptima, siendo esta la que mostró el mejor contraste entre núcleos teñidos y no teñidos, sin un aumento significativo de la tinción del fondo de la muestra.

6.5.2 Método de cuantificación y análisis de la inmunohistoquímica para MGMT

Para el análisis de la tinción inmunohistoquímica se seleccionaron dos campos 400x de aumento de dos secciones de cada caso. Como criterios de 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.

Para el conteo sólo se consideró la tinción nuclear y se establecieron las siguientes categorías según intensidad de la tinción:

1. **Células de tinción fuerte o intermedia:** Aquellas células cuyo núcleo se tiñó en forma homogénea y con una intensidad similar al endotelio adyacente se consideraron de tinción intermedia, dado que la tinción normal del endotelio se ha utilizado como control positivo interno y referencia para la tinción intermedia en estudios previos.^{47,48} Toda célula cuyo núcleo se tiñe con mayor intensidad se consideró de tinción fuerte.
2. **Células de tinción débil:** En esta categoría se clasifican todos los núcleos con tinción presente, pero de menor intensidad que la referencia del endotelio o con un patrón no homogéneo.
3. **Células negativas:** Se consideran negativas las células cuyos núcleos sólo muestran tinción de hematoxilina.

Para facilitar el conteo, se utilizó una grilla de 3x3 que dividió el campo en 9 cuadros que se contaron por separado (ver figura 3 en anexo). La suma de núcleos de las tres categorías descritas representa el total de núcleos presentes en el campo. Sobre este total se calculan los porcentajes que representan cada una de las categorías.

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 y se basó en las características histológicas de estos tipos celulares. El algoritmo utilizado para la evaluación de cada campo se presenta en la figura 4 (ver anexo).

6.6 Obtención de datos clínicos

Los datos clínicos de interés, incluyendo antecedentes demográficos, del diagnóstico y tratamiento fueron recolectados a partir de los registros clínicos, estadísticas y base de datos disponibles del Instituto de Neurocirugía Dr. Asenjo (INCA). Los datos de supervivencia requirieron de la consulta del registro de defunciones del Registro Civil.

6.7 Análisis estadístico

Todos los datos serán analizados en Excel 2012.

6.8 Bioética

El estudio fue presentado y contó con la aprobación al Comité ético-científico del Servicio de Salud Metropolitano Oriente y de la dirección del Instituto de Neurocirugía Asenjo. Durante el desarrollo de la tesis se siguieron estrictamente las normas para el manejo de muestras biológicas y registros clínicos.

6.9 Recursos disponibles

Las muestras de tejido tumoral fueron recolectadas a partir de tacos de biopsias pertenecientes al Laboratorio de Neuropatología del Instituto de Neurocirugía Asenjo (INCA). El neuropatólogo jefe de la unidad, Dra. Claudia Tissera, facilitó las muestras necesarias cumpliendo con los protocolos y recomendaciones del INCA y del comité de ética correspondiente.

La tinción de hematoxilina eosina y la inmunohistoquímica para MGMT se realizaron en el Laboratorio de Investigación Biomédica de la sede Oriente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Este laboratorio cuenta con el instrumental necesario para técnicas de histología e inmunohistoquímica, además de las instalaciones y el equipamiento suficiente para la metodología presentada. El laboratorio cuenta con tecnólogo médico con vasta experiencia en dichas técnicas, quien colaboró activamente en el desarrollo de todas las actividades que se llevaron a cabo en el laboratorio.

Finalmente, este estudio contó con un financiamiento parcial, otorgado por el Departamento de Ciencias Neurológicas Sede Oriente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile mediante concurso (FIDECNO año 2012).

7 RESULTADOS

7.1 Objetivo específico 1

Determinar el nivel de expresión de MGMT en tejido tumoral de pacientes chilenos con diagnóstico de glioblastoma multiforme.

En el presente informe se describen los resultados obtenidos en 29 de los 30 casos que se proyectó analizar. La calidad de la fijación de la muestra de uno de los casos seleccionados impidió realizar una correcta tinción inmunohistoquímica en repetidas ocasiones y fue eliminado del análisis. Previo a la tinción inmunohistoquímica se corroboró el diagnóstico histopatológico de todos los casos mediante tinción con hematoxilina-eosina.

Los 29 casos correctamente teñidos para MGMT se analizaron según el método descrito en la estandarización de la técnica. Se utilizaron 2 secciones no consecutivas de 5 µm de cada caso y se cuantificaron manualmente un total de 4 campos de cada caso, correspondientes a 2 campos de cada sección teñida.

La mediana de células contados con este método por caso fue de 692 (RIC 494-928). Se contó por separado cada categoría de células en base a la tinción nuclear descrita previamente. En el caso de las células de tinción fuerte/media la mediana fue de 51 (RIC 30-130), mientras que para las de tinción débil fue de 119 (RIC 69-155) y en el caso de las células negativas para la tinción MGMT fue de 412 (RIC 219-730).

Al estimar los porcentajes que el conteo de cada tipo celular representa sobre el total de células tumorales presentes en la muestra se obtuvo una mediana de 10% (RIC 4-24%), 16% (RIC 10-26%) y 71% (RIC 52-85%) para las células de tinción fuerte/media, débil y negativa respectivamente. En la tabla 1 se muestran los resultados de los 29 casos evaluados.

7.2 Objetivo específico 2

Estimar el efecto de la variable cuantitativa de intensidad en el análisis del nivel de expresión de MGMT mediante inmunohistoquímica.

Para estimar el efecto de la intensidad en la evaluación de la tinción inmunohistoquímica para MGMT se clasificó cada caso estudiado en base al porcentaje de células teñidas y a la clasificación de intensidad de tinción nuclear.

El punto de corte para considerar un caso positivo para la expresión de MGMT fue de 10% de células teñidas. Este punto de corte es el que más comúnmente se ha utilizado en los estudios previos. Al considerar sólo las células de tinción fuerte/media y utilizando el punto de corte de 10%, 15 de los 29 casos resultaron positivos para la expresión de MGMT, correspondiente al 52% de la muestra.

Cuando se suman las células de tinción fuerte/media con las de tinción débil y se estima la proporción que este grupo representa sobre el total de células tumorales se obtiene una mediana de 29% (RIC 15-48%). Al utilizar este parámetro y el mismo punto de corte de 10%, 26 de los casos estudiados son considerados positivos para

la expresión de MGMT, correspondiente al 90%. De esta forma 11 casos que habían sido clasificados como negativos por el parámetro anterior, se reclasificaron a positivas al incorporar las células de tinción débil para MGMT. Los porcentajes y clasificación de cada uno de los casos se muestran en la tabla 2. (ver anexo)

7.3 Objetivo específico 3

Correlacionar el nivel de expresión de MGMT con los antecedentes clínicos de los pacientes con glioblastoma multiforme.

Se recolectó la información clínica de los 30 pacientes seleccionados para el estudio. La principal fuente de información fueron las fichas clínicas del Instituto de Neurocirugía Asenjo y el registro de defunciones del Registro civil. Se obtuvieron los datos demográficos de todos los casos. 12 de los 30 casos fueron mujeres, correspondiente al 40% de la muestra. El promedio de edad al momento del diagnóstico fue de 54,8 años (rango 34-72 años).

En sólo 2 casos existía el antecedente de un glioma previo al diagnóstico del glioblastoma multiforme. Uno de ellos correspondía a un astrocitoma fibrilar difuso grado II resecado parcialmente 4 años antes de la presentación del glioblastoma multiforme, y cuya recaída se manifestó por un status convulsivo y la aparición de una hemiparesia nueva. El segundo caso correspondía a un astrocitoma pilocítico anaplásico operado 2 años antes del diagnóstico y tratado posteriormente con radioterapia. En este caso la recidiva tumoral fue pesquisada en un control imagenológico.

En cuanto a la presentación clínica, las manifestaciones más frecuentes fueron la aparición de un déficit focal motor o sensitivo presente en el 60% de los casos y la historia de una cefalea nueva en el 43% de los pacientes. Con menor frecuencia se presentó un síndrome afásico y crisis convulsivas, ambas en un 27% de los casos. Finalmente en 4 casos (13%) se presentó con algún grado de compromiso de conciencia, en 2 casos (7%) existía historia de deterioro cognitivo y en 1 caso (3%) la presentación fue la aparición de una hemianopsia homónima. De acuerdo al examen neurológico descrito en ficha, al menos en 4 casos pudo establecerse un síndrome de hipertensión endocraneana al momento de consultar. En 28 de los 30 casos fue posible identificar con certeza un tiempo de evolución antes del diagnóstico y este fue de 3,6 meses en promedio (rango 0-24 meses). En la tabla 3 se detallan los principales antecedentes clínicos recogidos. (ver anexo)

En cuanto al estudio diagnóstico, se contó con estudio imagenológico prequirúrgico en todos los casos. En 25 de ellos se realizó resonancia magnética y en 5 pacientes se realizó tomografía axial computada de cerebro. De todos los casos se obtuvo muestra para biopsia durante cirugía resectiva parcial en 15 de ellos, cirugía resectiva total en 13 casos y a través de biopsia estereotáxica en 2 casos.

En la muestra estudiada, sólo 3 de los pacientes recibieron el tratamiento considerado estándar consistente en cirugía resectiva, radioterapia y quimioterapia. Por lo tanto, no fue posible determinar una tasa de respuesta al tratamiento estándar de esta muestra. 10 de los 30 casos recibieron radioterapia en algún momento de la

evolución y sólo 3 recibieron quimioterapia. No se pudo acceder al detalle del esquema utilizado, pero al menos en un caso existe la certeza de que el tratamiento recibido incluyó temozolamida.

A la fecha, todos los pacientes han fallecido, por lo que se hablará de supervivencia global. En este estudio se consideró tiempo cero la fecha del procedimiento quirúrgico con el que se estableció el diagnóstico. La mediana de supervivencia global fue de 5,3 meses (RIC 3,4-12,8 meses). En el caso de los pacientes que recibieron quimioterapia, el promedio de sobrevida global fue de 19,9 meses, mientras que para el resto de la muestra fue de 6,8 meses. En la tabla 4 se presentan los tratamientos recibidos y el desenlace clínico de los pacientes de la muestra. (ver anexo)

Al correlacionar la sobrevida de los pacientes de la muestra con la clasificación del nivel de expresión de MGMT por inmunohistoquímica, no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia global entre los considerados positivos y los negativos para MGMT por ninguno de los dos métodos de clasificación presentados en el objetivo 2. En la figura 5 se muestran las curvas de Kaplan-Meier para ambos casos. (ver anexo)

Una de las mayores limitantes fue no contar con datos del seguimiento imagenológico post tratamiento en las fichas clínicas. Por este motivo no fue posible estimar tasas de progresión o intervalos libres de progresión y/o enfermedad.

8 DISCUSION

1. Análisis de los resultados obtenidos

El método aplicado permitió cumplir el primer objetivo específico del estudio, esto es, conocer mediante una técnica de tinción inmunohistoquímica el nivel de expresión de MGMT en un grupo de pacientes chilenos. Para comparar estos resultados con lo reportado en la literatura se presentan varios problemas. El primero es que en este estudio se presentan dos posibles resultados, dependiendo de si se consideran o no las células de tinción débil. Si se consideran sólo las de tinción fuerte/media la proporción de pacientes que se pueden considerar positivos para la expresión de MGMT es de 52%, mientras que si se agregan la de tinción débil el porcentaje alcanza el 90%. Por otra parte, el porcentaje de positividad reportado en los estudios previos es muy variable y depende directamente del método de tinción y conteo. Por último, el diagnóstico del comportamiento de MGMT depende del punto de corte utilizado que, como se discutirá más adelante, puede responder a diferentes criterios.

El segundo objetivo específico, que consistió en incorporar la intensidad como una variable cuantificable, se cumplió cabalmente y representa una innovación en el método de evaluación de la inmunohistoquímica. A la fecha, sólo un estudio había incorporado un puntaje de intensidad pero sin una cuantificación del número de células con cada nivel de intensidad para una determinada muestra.⁴⁸ Utilizando el endotelio vascular como referencia de intensidad intermedia, se cuantificó y se estimaron porcentajes para los tipos celulares de tinción fuerte/media y débil. Estos

valores no están presentes en otras publicaciones de la forma en que han sido aquí expuestos.

La interpretación de los porcentajes de cada tipo celular y el comportamiento de MGMT en cada caso requieren de un análisis del método de tinción y conteo a partir de la literatura disponible y la experiencia adquirida a lo largo del desarrollo de esta tesis. Cabe destacar que la correlación entre el nivel de expresión y el estado de metilación del promotor no es siempre directa y por tanto los datos aquí presentados no permiten inferirlo.

2. De la técnica de tinción inmunohistoquímica para MGMT

La mayor parte de los estudios conducidos a la fecha utilizan el anticuerpo monoclonal de ratón MT 3.1.³⁸ Sin embargo, existen diferentes fabricantes y cada uno recomienda una dilución distinta para el uso correcto del anticuerpo. Al revisar los distintos estudios destaca que el rango de diluciones utilizado va de 1:2 a 1:100. El anticuerpo utilizado en este trabajo es producido por abcam® y la recomendación del fabricante es que sea utilizado en una dilución de 1:100. Sin embargo, por la heterogeneidad en los protocolos publicados y los resultados obtenidos con la primera tinción en la dilución de 1:100 se decidió determinar la dilución óptima del anticuerpo primario por medio de una titulación. La dilución definida como óptima mantuvo su buen rendimiento en todas las tinciones sucesivas.

Otro aspecto relevante es la selección del tejido apropiado para el estudio inmunohistoquímico. Se procuró teñir secciones adyacentes a las secciones en las que se confirmó la presencia de tejido tumoral abundante. Pese a este criterio y los aplicados en la selección de campos para conteo, existen otras posibles fuentes de error relacionadas con la elección del tejido a estudiar. En publicaciones recientes se ha documentado una significativa heterogeneidad en el fenotipo celular al interior de una misma masa tumoral en la que pueden identificarse al menos 3 capas concéntricas de características particulares y que se correlacionan con el gradiente de la tensión de oxígeno al interior del tumor.^{47,49} Mediante inmunohistoquímica se ha demostrado que este modelo de 3 capas también existe un gradiente de expresión de MGMT, decreciente desde el centro hacia la periferia, incluso con un estado de metilación del promotor MGMT homogéneo.⁵⁰ Sin embargo, también ha sido documentado un incremento en la expresión nuclear de MGMT en la zona de infiltración con respecto al centro del tumor.⁵¹

Por este motivo, el estudio de sólo una muestra de tejido podría no ser representativo del nivel de expresión del todo el tumor. Asimismo, el uso de neuroimágenes como guía para la toma de muestras provenientes de distintas profundidades de la masa tumoral es una interesante corrección del método en un eventual estudio prospectivo.

3. Del método de evaluación de la tinción inmunohistoquímica para MGMT

Los estudios publicados a la fecha difieren en el número de muestras y campos a analizar para cada caso. Desde protocolos que contemplan el conteo manual de varios campos y de diferentes muestras hasta otros en que sólo se cuenta un campo y este se multiplica por el número de campos presentes en la muestra.^{34,38,52} Por lo tanto, el criterio de dos campos distantes provenientes de dos cortes no consecutivos está dentro del rango considerado en los protocolos publicados.

En relación a la selección de los campos para conteo, se aplicaron los criterios descritos en el método y una adaptación del algoritmo desarrollado por Preusser et al.³⁷ Este es uno de los pocos algoritmos publicados para la evaluación visual de la inmunohistoquímica de MGMT y consiste en una secuencia de 4 preguntas que el observador debe responder antes de incluir el campo en el conteo. La primera pregunta hace referencia a la presencia de al menos un 30% de tejido tumoral en el campo. La segunda pregunta consiste en la estimación del porcentaje de células positivas, y las últimas dos preguntas permiten la exclusión de células no tumorales que normalmente expresan MGMT. En el presente estudio se adaptó este cuestionario a fin de incorporar la variable de intensidad como se explicará más adelante. En la figura 4 se presenta el algoritmo utilizado. (ver anexo)

Durante la primera fase del desarrollo de esta tesis se advirtieron diferentes intensidades de tinción nuclear incluso en una misma sección o campo. Aún en la dilución considerada óptima se advirtió la presencia de un grupo células tumorales

cuyos núcleos se tiñen en forma débil o heterogénea. La mayor parte de los estudios publicados no discriminan entre las distintas intensidades de tinción ni evalúan el impacto de esta variable en la actividad de MGMT.⁴⁷ Sólo en el estudio de Miyazaki et al. se incluyó un score de intensidad global, puntaje asignado a cada caso en forma cualitativa en una escala de 0 a 3 y que se suma a un puntaje derivado de la proporción de núcleos teñidos para obtener un puntaje compuesto final. Esto permite que casos en que el porcentaje de células teñidas está bajo el punto de corte puedan considerarse positivas gracias al puntaje que pueden obtener por la intensidad de la tinción. Estos casos considerados de expresión mínima mostraron buena correlación con el desenlace clínico.⁴⁸ Sin embargo, el principal problema de este método es que se basa en una impresión global de la intensidad de la muestra y no evalúa la intensidad de tinción de cada núcleo de la muestra. .

Por este motivo no se utilizó el sistema de evaluación de Miyazaki et al. y se prefirió diseñar un método que permitió conocer y cuantificar la proporción e importancia de las células consideradas de tinción débil o heterogénea en el análisis global de la tinción. Si bien se excluyeron visualmente las células no tumorales que expresan MGMT incluyendo el endotelio vascular y linfocitos perivasculares, estos tipos celulares no fueron cuantificados. Cabe destacar que no hay un sistema de clasificación similar en la literatura disponible a la fecha por lo que se propone como un nuevo sistema de evaluación.

En el presente estudio se utilizó el punto de corte de 10% por ser el más

utilizado en los estudios previos y ante la imposibilidad de establecer un punto de corte a partir de los datos del estudio. Esto porque al no contar con datos de respuesta a quimioterapia no es posible establecer el porcentaje de células positivas que mejor discrimina entre respondedores y no-respondedores. Sin embargo, es interesante comentar la metodología por la cual otros estudios han determinado su punto de corte. Como se dijo, la mayoría ha adoptado el punto de corte de 10%. Sin embargo, en el caso del estudio de Lalezari et al, se definió la mediana de proporción de células positivas de la muestra como el punto de corte. En el caso de dicho estudio esta mediana fue de 30%, muy similar a la mediana de 29% de células positivas independiente de su intensidad del presente estudio. Otro caso interesante de comentar es el de Capper et al, donde el punto de corte se definió en base al poder de predecir la respuesta a la quimioterapia en la muestra analizada. En el caso del presente estudio la gran mayoría de los pacientes no recibieron quimioterapia y no fue posible determinar un punto de corte de esta forma.

Si bien se ha logrado establecer un método de tinción y conteo que considera la intensidad como una variable cuantitativa, no ha sido posible correlacionar estos resultados con las medidas de respuesta a quimioterapia, puesto que la mayoría de los pacientes evaluados no recibieron el tratamiento estándar. Esta limitación del diseño del estudio ha sido abordada en los informes previos y se discute más abajo.

4. De los antecedentes clínicos de los casos

La revisión de fichas clínicas permitió obtener información valiosa de las características demográficas de los pacientes estudiados, las manifestaciones clínicas predominantes, el esquema de estudio diagnóstico, el tratamiento recibido y el desenlace clínico. Sin embargo, el hecho de que sólo 3 pacientes hayan recibido quimioterapia limita las conclusiones que pueden extraerse del presente estudio, puesto que la correlación del comportamiento de MGMT con la respuesta a la quimioterapia con temozolamida es la que permite evaluar la utilidad de los diferentes métodos propuestos para el estudio de MGMT en glioblastoma.

Sin embargo y si bien este estudio no tiene la capacidad de concluir respecto al efecto del tratamiento estándar, cabe destacar que los pacientes con mayor supervivencia global corresponden a los 3 pacientes que recibieron radioterapia y quimioterapia en su esquema de tratamiento, con un promedio de supervivencia que alcanzó los 19,9 meses.

5. Del diseño del proyecto de tesis:

La principal dificultad en la interpretación de los resultados de los estudios que han intentado correlacionar el estudio inmunohistoquímico de MGMT con el estado de metilación del promotor y la respuesta a la quimioterapia estándar son las deficiencias en el diseño de los estudios. En el desarrollo de la presente tesis se han señalado las principales dificultades enfrentadas durante la etapa experimental del proyecto. Si bien el hecho de que los pacientes estudiados no hayan recibido

tratamiento con temozolamida limita la posibilidad de correlacionar los resultados con medidas de respuesta a quimioterapia, el método de análisis empleado permite reconocer y cuantificar un grupo de células tumorales que constituyen una potencial fuente de error en la interpretación de la tinción inmunohistoquímica para MGMT.

Por este motivo, el diseño de la presente tesis fue revisado y replanteado, acogiendo además las crítica de los revisores en cuanto a la falta de un gold estándar o criterio de referencia contra el que comparar los resultados de este versus otros métodos de conteo.

9 CONCLUSION

El presente estudio constituye el primer intento por determinar la expresión de MGMT en pacientes chilenos con diagnóstico histopatológico de Glioblastoma multiforme. El aporte de este estudio es la estandarización de un protocolo para la definición inmunohistoquímica de MGMT, fácilmente reproducible en los laboratorios de neuropatología de nuestro medio. Otro aporte es haber logrado incorporar la variable intensidad a través de proponer un método alternativo en el análisis de la tinción, lo que abre un debate en torno a la relevancia de esta variable la estimación global de la presencia de MGMT en una muestra. Sin embargo, estos procedimientos deberán ser evaluados en futuros estudios que permitan establecer su validez en relación a la respuesta con la quimioterapia. Se espera que este estudio sea recogido y valorado por el Instituto de Neurocirugía Asenjo, como parte importante del procedimiento diagnóstico y pronóstico de todo caso de Glioblastoma multiforme.

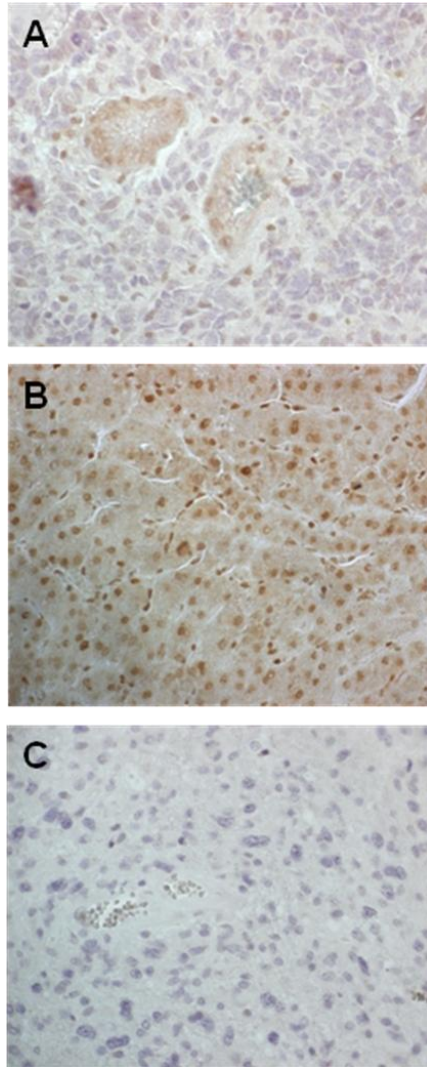
10 ANEXO (FIGURAS Y TABLAS)

Figura 1: Tinciones de control para MGMT en dilución 1:50. A) Control positivo interno (endotelio); B) Control positivo externo (tejido hepático sano); C) Control negativo (glioblastoma).

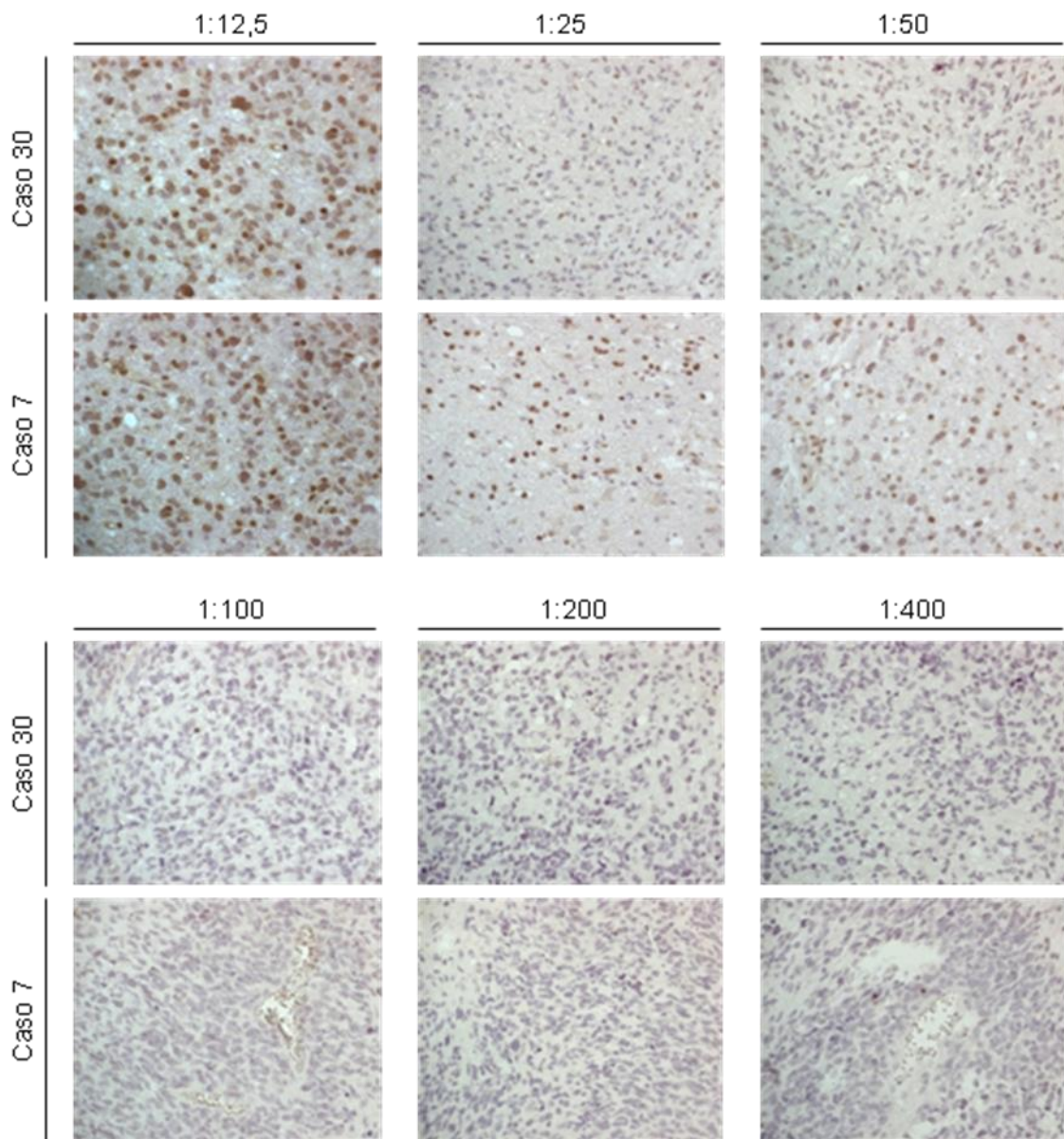


Figura 2: Estandarización de la dilución del anticuerpo monoclonal de ratón clon MT3.1 para tinción inmunohistoquímica de MGMT en muestras de glioblastoma de dos casos (casos 7 y 30). Se muestran las imágenes obtenidas para diluciones crecientes (1:12,5; 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400). Se observan los núcleos teñidos con hematoxilina y en color café aquellos teñidos para MGMT.

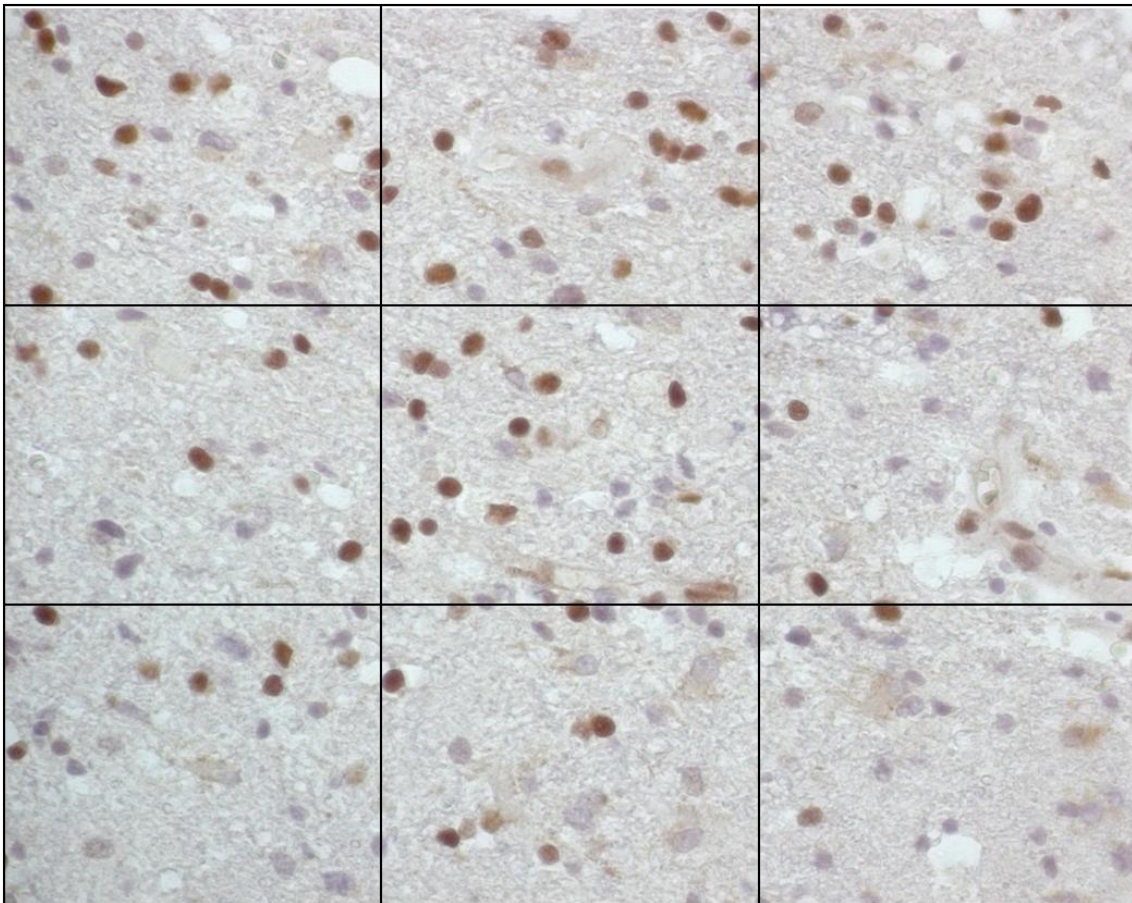


Figura 3: Grilla para conteo de células sobre un campo 400x de un caso teñido con anticuerpo MT3.1 y hematoxilina. La grilla divide el campo en 9 cuadros que se cuentan por separado.

Pregunta		Posibles respuestas
		Si
1	¿Hay tejido tumoral evaluable?	No (no hay tejido tumoral o es <30% del campo)
2	¿Hay células inmunorreactivas para MGMT?	Si No
3	3a ¿Existen células endoteliales inmunorreactivas?	Si No
	3b ¿Existen células hematógenas inmunorreactivas?	Si (ej: linfocitos) No
4	4a ¿Cuántas células tumorales inmunorreactivas hay en el campo?	Tinción fuerte/media: Tinción débil:
	4b ¿Cuántas células tumorales negativas para MGMT hay en el campo?	

Figura 4: Algoritmo utilizado para la evaluación de cada campo evaluado, adaptado de Preusser et al. 2008. Las preguntas se presentan en el orden en que se utilizaron.

Caso	Fuerte/media		Débil		Negativas		total
	n	%	n	%	n	%	n
1	51	4%	127	11%	986	85%	1164
2	26	5%	83	16%	400	79%	509
3	52	11%	186	38%	256	52%	494
4	151	32%	95	20%	219	47%	465
5	30	2%	169	14%	1036	84%	1235
6	0	0%	25	5%	448	95%	473
7	157	23%	155	22%	384	55%	696
8	225	24%	54	6%	649	70%	928
9	22	2%	125	10%	1120	88%	1267
10	30	5%	124	19%	508	77%	662
11	92	47%	58	30%	46	23%	196
12	13	1%	64	6%	913	92%	990
13	47	14%	87	26%	198	60%	332
14	51	9%	198	37%	292	54%	541
15	105	13%	123	16%	557	71%	785
16	34	3%	54	5%	1041	92%	1129
17	130	27%	69	14%	286	59%	485
18	11	1%	87	11%	665	87%	763
19	236	45%	119	22%	174	33%	529
20	32	4%	182	23%	574	73%	788
21	106	27%	103	27%	179	46%	388
22	21	7%	16	6%	249	87%	286
23	323	48%	300	45%	49	7%	672
24	66	10%	214	31%	412	60%	692
25	492	71%	94	14%	104	15%	690
27	197	13%	126	9%	1158	78%	1481
28	123	17%	379	53%	214	30%	716
29	50	6%	67	8%	730	86%	847
30	23	2%	151	16%	764	81%	938
Medianas	51	10%	119	16%	412	71%	692
RIC	100	20%	86	16%	511	33%	434
Q1-Q3	(30-130)	(4-24%)	(69-155)	(10-26%)	(219-730)	(52-85%)	(494-928)

Tabla 1: Resultados agrupados de todos los campos contados para cada uno de los 29 casos estudiados. No se obtuvo resultado del caso 26 y se omite en la tabla. Se muestran las cantidades y porcentajes de células con tinción fuerte e intermedia; débil y negativa para cada uno de los casos.

Caso	Clasificación células según intensidad				Clasificación de la expresión de MGMT		
	Fuerte/media (%)	Débil (%)	Negativas (%)	Fuerte/media/débil (%)	Fuerte/media ≥10%	Fuerte/media/débil ≥10%	Reclasificadas (si/no)
1	4%	11%	85%	15%	negativo	positivo	si
2	5%	16%	79%	21%	negativo	positivo	si
3	11%	38%	52%	48%	positivo	positivo	no
4	32%	20%	47%	53%	positivo	positivo	no
5	2%	14%	84%	16%	negativo	positivo	si
6	0%	5%	95%	5%	negativo	negativo	no
7	23%	22%	55%	45%	positivo	positivo	no
8	24%	6%	70%	30%	positivo	positivo	no
9	2%	10%	88%	12%	negativo	positivo	si
10	5%	19%	77%	23%	negativo	positivo	si
11	47%	30%	23%	77%	positivo	positivo	no
12	1%	6%	92%	8%	negativo	negativo	no
13	14%	26%	60%	40%	positivo	positivo	no
14	9%	37%	54%	46%	negativo	positivo	si
15	13%	16%	71%	29%	positivo	positivo	no
16	3%	5%	92%	8%	negativo	negativo	no
17	27%	14%	59%	41%	positivo	positivo	no
18	1%	11%	87%	13%	negativo	positivo	si
19	45%	22%	33%	67%	positivo	positivo	no
20	4%	23%	73%	27%	negativo	positivo	si
21	27%	27%	46%	54%	positivo	positivo	no
22	7%	6%	87%	13%	negativo	positivo	si
23	48%	45%	7%	93%	positivo	positivo	no
24	10%	31%	60%	40%	positivo	positivo	no
25	71%	14%	15%	85%	positivo	positivo	no
27	13%	9%	78%	22%	positivo	positivo	no
28	17%	53%	30%	70%	positivo	positivo	no
29	6%	8%	86%	14%	negativo	positivo	si
30	2%	16%	81%	19%	negativo	positivo	si

Tabla 2: Se presentan los porcentajes de células con tinción fuerte e intermedia, débil y negativa para cada uno de los casos. A continuación se muestra el porcentaje total producto de la suma de las células de tinción fuerte, intermedia y débil. Finalmente se clasifica cada caso como positivo o negativo para la expresión de MGMT, según se considere o no el grupo de células de tinción débil como positivas. La última columna señala aquellos casos que se reclasificaron de negativo a positivo al incluir las células de tinción débil.

Caso	Sexo	Glioma previo	Motivo de consulta	Hallazgos del examen neurológico	tiempo de evolución al consultar	Edad al diagnóstico
1	F	No	Hallazgo en neuroimagen	Hemiplejía izquierda y disartria	0	68 años
2	M	No	Mareos y alteración de la marcha	Afasia motora y hemiparesia derecha	12	53 años
3	M	No	Trastorno del lenguaje	Afasia sensitiva y paresia facial central derecha	2	51 años
4	M	No	Crisis de ausencia	Examen neurológico normal	24	64 años
5	F	No	Trastorno del lenguaje y déficit motor izquierdo	Afasia transcortical motora y hemiparesia izquierda.	0	63 años
6	F	No	Cefalea y deterioro cognitivo	Deterioro cognitivo no amnésico	0,3	61 años
7	F	No	Se desconoce	Se desconoce	Se desconoce	63 años
8	F	No	Cefalea	Confusión, edema de papila y hemihipoestesia izquierda	0,8	36 años
9	M	No	Crisis convulsiva generalizada	Paciente vigil, orientado, sin déficit neurológico.	4	44 años
10	M	No	Trastorno del lenguaje	Afasia motora	3	57 años

Tabla 3: Síntesis de los principales antecedentes clínicos de los 30 casos seleccionados para el estudio. Todos los datos fueron recogidos de las fichas clínicas del Instituto de Neurocirugía Asenjo. Continúa en las siguientes dos páginas.

Caso	Sexo	Glioma previo	Motivo de consulta	Hallazgos del examen neurológico	tiempo de evolución al consultar	Edad al diagnóstico
11	F	No	Cefalea y vómitos	Hemiparesia y hemihpoestesia izquierda	1	62 años
12	F	si	Crisis convulsiva parcial motora izquierda	Examen neurológico normal	0	30 años
13	F	No	Cefalea y desorientación	afasia motora y hemiparesia derecha	0	59 años
14	M	No	Cefalea y crisis covulsiva tónico clónica generalizada	Afasia mixta	24	34 años
15	M	No	Debilidad crural izquierdo y crisis convulsiva tónico clónica generalizada	Hemiparesia izquierda	3	59 años
16	F	No	Cefalea y déficit motor izquierdo	Hemiparesia izquierda	1	40 años
17	M	No	Cefalea y pérdida de campo visual	Hemianopsia homónima temporal izquierda	4	59 años
18	F	No	Crisis convulsiva tónica generalizada	Afasia sensitiva, hemiparesia e hipoestesia derecha	2	59 años
19	M	No	Cefalea	Examen neurológico normal	2,5	72 años
20	F	No	Cefalea	Afasia sensitiva	6	52 años

Tabla 3: Continuación

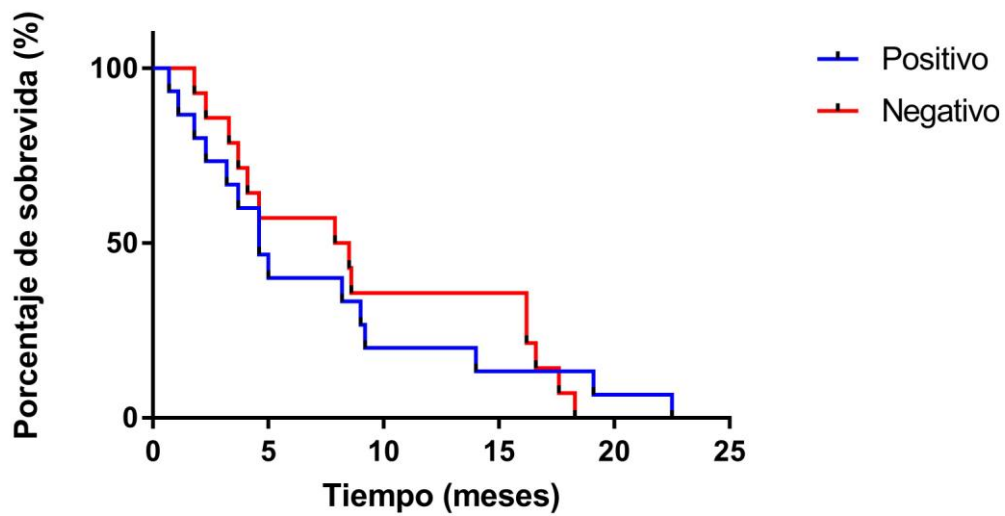
Caso	Sexo	Glioma previo	Motivo de consulta	Hallazgos del examen neurológico	tiempo de evolución al consultar	Edad al diagnóstico
21	M	No	Inestabilidad de la marcha y debilidad del hemicuerpo izquierdo	Hemiparesia izquierda	3	64 años
22	F	No	Compromiso de conciencia	Compromiso de conciencia y hemiparesia izquierda	Se desconoce	45 años
23	M	Si	Pesquisa en control de policlínico neurocirugía	Desorientación y déficit motor derecho nuevo	0	41 años
24	M	No	Cefalea y debilidad del hemicuerpo izquierdo	Desorientación, parálisis del sexto para derecho y hemiparesia izquierda	2	52 años
25	M	No	Crisis convulsiva tónico clónica generalizada	Hemiparesia izquierda	0	56 años
26	M	No	Compromiso de conciencia	Confusión y hemiparesia derecha	2	66 años
27	F	No	Cefalea y desorientación	Síndrome confusional	1	56 años
28	M	No	Debilidad progresiva del hemicuerpo derecho	Hemiparesia derecha	1	62 años
29	M	No	Cefalea y vómitos	Examen neurológico normal	1	67 años
30	M	No	Cefalea y debilidad del hemicuerpo izquierdo	Se describe examen neurológico normal	1,5	48 años

Tabla 3: Continuación

Caso	Tratamiento			Desenlace	
	Cirugía	Radioterapia	Quimioterapia	Fallecidos	Supervivencia global (meses)
1	Resección parcial	Si	No	Si	8,5
2	Biopsia estereotáxica	No	No	Si	4,6
3	Resección parcial	No	No	Si	2,3
4	Resección parcial	No	No	Si	9,0
5	Resección parcial	No	No	Si	16,6
6	Resección parcial	No	No	Si	3,3
7	Resección total	No	Si	Si	22,5
8	Resección parcial	No	No	Si	9,2
9	Resección total	No	No	Si	16,2
10	Resección total	Si	No	Si	2,3
11	Resección parcial	No	No	Si	3,7
12	Resección parcial	No	No	Si	1,8
13	Resección total	No	No	Si	1,1
14	Resección total	No	No	Si	3,7
15	Resección total	Si	Si	Si	19,1
16	Resección parcial	Si	Si	Si	18,3
17	Resección parcial	Si	No	Si	5,0
18	Resección total	Si	No	Si	16,2
19	Resección parcial	Si	No	Si	14,0
20	Resección parcial	Si	No	Si	17,6
21	Resección total	No	No	Si	4,6
22	Resección total	No	No	Si	4,1
23	Resección total	No	No	Si	4,6
24	Resección total	No	No	Si	3,2
25	Resección parcial	No	No	Si	1,8
26	Resección parcial	No	No	Si	5,6
27	Biopsia estereotáxica	No	No	Si	0,7
28	Biopsia estereotáxica	Sí	No	Si	8,2
29	Resección total	No	No	Si	8,6
30	Resección parcial	No	No	Si	7,9

Tabla 4: Síntesis del tratamiento recibido y desenlace clínico de los pacientes de la serie. En el ítem cirugía se incluyen los casos en que se realizó biopsia estereotáxica sin resección. Para el cálculo de la supervivencia global se consideró el momento del diagnóstico como referencia.

A)



B)

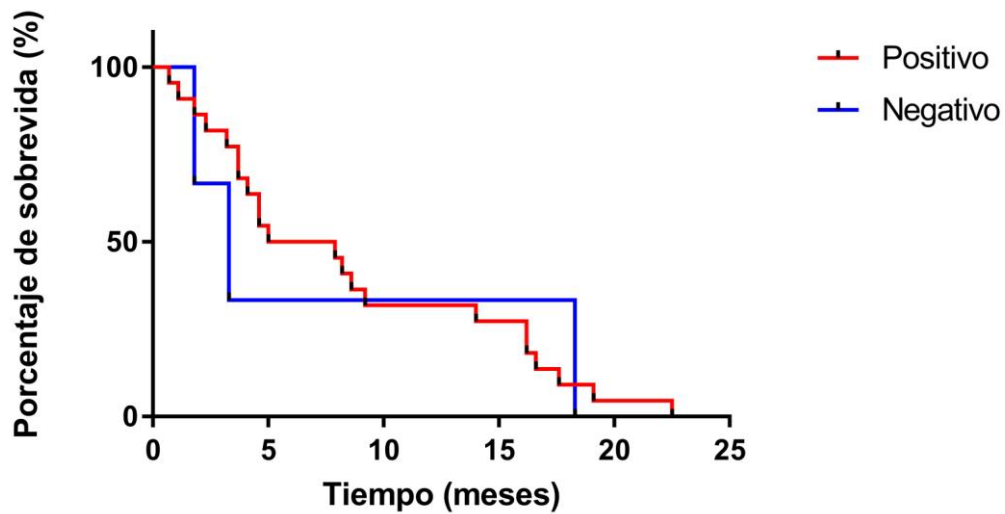


Figura 5: Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global de los pacientes de la muestra según el diagnóstico de la expresión de MGMT por ambos métodos de clasificación (caso positivo o negativo para MGMT). No hubo diferencias significativas al excluir (A) ni al incluir (B) las células de tinción débil en la clasificación.

11 BIBLIOGRAFIA

1. Dolecek T a, 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.* 2012;14 Suppl 5:v1-v49.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.
3. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, 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.* 2009;10(5):459-466.
4. *Indicadores Básicos de Salud 2009-2011.*; Ministerio de Salud. Chile. 2011.
5. Díaz V, Yáñez A, Ponce C, Villegas PJ. Tendencia de la mortalidad por tumores cerebrales malignos en Chile. Análisis de tasas. *Rev Chil Neuro-Psiquiat.* 2006;44:263-270.
6. Quezada C, Segura R, Riquelme F, Z DR, Ayach F. Glioblastoma multiforme y estudio de la resistencia a la quimioterapia mediada por transportadores ABC. 2011:415-424.
7. Kleihues P, Cavenee W. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. World Health Organization Classification of Tumours.* Lyons: IARC Press; 2000.
8. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* 1993;3(3):255-268.
9. Meir EG Van, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu H. Exciting New Advances in

- Neuro-Oncology The Avenue to a Cure for Malignant Glioma. 2010.
10. Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. 2000;100:57-70.
 11. Lichtenstein A V. On evolutionary origin of cancer. *Cancer Cell Int.* 2005;5(1):5.
 12. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21(21):2683-2710.
 13. Cancer T, Atlas G. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455(7216):1061-1068.
 14. Verhaak RGW, Hoadley K a, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010;17(1):98-110.
 15. Nagarajan RP, Costello JF. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(3):188-197. doi:10.1016/j.semcancer.2009.02.005.
 16. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, et al. REVIEWS MGMT promoter methylation in malignant gliomas : ready for personalized medicine ? *Nat Rev Neurol.* 2010;6(1):39-51.
 17. Christmann M, Verbeek B, Roos WP, Kaina B. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1816(2):179-190.
 18. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4. 2004:296-307.

19. Pegg a E. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res.* 2000;462(2-3):83-100.
20. Kreth S, Thon N, Eigenbrod S, et al. O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation. *PLoS One.* 2011;6(2):e17156.
21. Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, et al. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene.* 2003;22(55):8835-8844.
22. Costello JF, Futscher BW, Kroes RA. factors from and suppressed expression of the Methylation-Related Chromatin Structure Is Associated with Exclusion of Transcription Factors from and Suppressed Expression of the O-6-Methylguanine DNA Methyltransferase Gene in Human Glioma Cell Lines. 1994.
23. Das P, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 2004;15(22):4632-4642.
24. Danam RP, Qian XC, Howell SR BT. Methylation of selected CpGs in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter region as a marker of gene silencing. *Mol Carcinog.* 1999;24(2):85-89.
25. Belanich M, Pastor M, Randall T, et al. Retrospective Study of the Correlation between the DNA Repair Protein Alkyltransferase and Survival of Brain Tumor Patients Treated with Carmustine Retrospective Study of the Correlation between the DNA Repair Protein Alkyltransferase and Survival of Brai.

- 1996:783-788.
26. Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, et al. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol*. 1998;16(12):3851-3857.
 27. Kreth F. Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. 2013:1363-1372.
 28. Preusser M. MGMT analysis at DNA, RNA and protein levels in glioblastoma tissue. *Histol Histopathol*. 2009;24:511-518.
 29. Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, 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*. 2012;118(17):4201-4211.
 30. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997-1003.
 31. Zhang K, Wang X, Zhou B, Zhang L. The prognostic value of MGMT promoter methylation in Glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Fam Cancer*. 2013;12(3):449-458.
 32. Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol*. 2009;11(4):348-356.
 33. 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*. 2011;11(1):35.
34. Lalezari S, Chou AP, Tran A, et al. Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome. *Neuro Oncol*. 2013;15(3):370-381.
 35. Sasai K et al. Careful Exclusion of Non-neoplastic Brain Components is Required for an Appropriate Evaluation of Relationship Between Immunohistochemistry and Methylation Analysis. 2008;32(8):1220-1227.
 36. Tang K, Jin Q, Yan W, et al. Clinical correlation of MGMT protein expression and promoter methylation in Chinese glioblastoma patients. *Med Oncol*. 2012;29(2):1292-1296.
 37. Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, et al. Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol*. 2008;18(4):520-532.
 38. 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*. 2012;138(11):1789-1797.
 39. Burke E, Grobler M, Elderfield K, 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*. 2013;1(1):22.

40. Weller M. Assessing the MGMT status in glioblastoma: one step forward, two steps back? *Neuro Oncol.* 2013;15(3):253-254.
41. Nakasu S, Fukami T, Baba K, Matsuda M. Immunohistochemical study for O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the non-neoplastic and neoplastic components of gliomas. *J Neurooncol.* 2004;70(3):333-340.
42. Rodriguez FJ, Thibodeau SN, Jenkins RB, et al. MGMT immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2008;16(1):59-65.
43. Nakagawa T, Ido K, Sakuma T, Takeuchi H, Sato K, Kubota T. Prognostic significance of the immunohistochemical expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein-1 in glioblastomas. *Neuropathology.* 2009;29(4):379-388.
44. Ramakrishnan V, Kushwaha D, Koay DC, Reddy H, Mao Y, Zhou L, Ng K, Zinn P, Carter B CC. Post-transcriptional regulation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase MGMT in glioblastomas. *Cancer Biomarkers.* 2012;10(185-193).
45. Cankovic M, Nikiforova MN, Snuderl M, et al. The role of MGMT testing in clinical practice: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2013;15(5):539-555.
46. Pieper RO. Understanding and manipulating O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression. *Pharmacol Ther.* 1997;74(3):285-297.
47. Hsu C-Y, Lin S-C, Ho H-L, et al. Exclusion of histiocytes/endothelial cells and using endothelial cells as internal reference are crucial for interpretation of

- MGMT immunohistochemistry in glioblastoma. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(2):264-271.
48. Miyazaki M, Nishihara H, Terasaka S, et al. Immunohistochemical evaluation of O(6) -methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expression in 117 cases of glioblastoma. *Neuropathology*. 2014;(November 2013).
 49. Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, et al. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells*. 2010;28(5):851-862.
 50. Della Puppa A, Persano L, Masi G, 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.
 51. Capper D, Mittelbronn M, Meyermann R, Schittenhelm J. Pitfalls in the assessment of MGMT expression and in its correlation with survival in diffuse astrocytomas: Proposal of a feasible immunohistochemical approach. *Acta Neuropathol*. 2008;115(2):249-259.
 52. Brell Doval M. Factores pronósticos en astrocitomas anaplásicos. 2011. Tesis. doi:978-84-694-6638-4.