



**Universidad**  
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

**INFLUENCIA DEL ESTADO DE  
METILACIÓN DEL GEN MGMT  
EN EL PRONÓSTICO DE  
PACIENTES DIAGNOSTICADOS  
DE GLIOBLASTOMA  
MULTIFORME:  
EPIGENETICA**

*Autor/es*

J Andrés González Fernández

*Director/es*

Dr. Jesús Aguas Valiente

Facultad de Medicina de Zaragoza

2016



## INDICE DE CONTENIDOS

- ABSTRACT. 2-3
- PALABRAS CLAVE. 3
- INTRODUCCIÓN. 3
- MATERIAL Y MÉTODOS. 3-4
- RESULTADOS.
  - GLIOBLASTOMA MULTIFORME
    - Aspectos epidemiológicos. 5
    - Aspectos anatomopatológicos. 5-7
    - Localización del cáncer. 7-8
    - Patogenia. 8-10
    - Clínica. 10-12
    - Comportamiento radiológico. 13-15
    - Tratamiento. 15-16
  - EPIGENÉTICA 16-17
    - Técnicas de estudio del DNA: Análisis de metilación. 17-25
    - Importancia del trabajo e investigación de Hegi. 25-26
    - Resultados del manejo del DNA neoplásico de nuestros pacientes.  
26-27
- DISCUSIÓN. 27-28
- CONCLUSIONES. 28-29
- BIBLIOGRAFÍA 29-30



## **ABSTRACT**

El glioblastoma multiforme es el tumor intracraneal primario más frecuente, y a su vez, el que peor pronóstico tiene por su elevada malignidad.

El perfil molecular del cáncer, es un aspecto de creciente interés, ya que está estrechamente relacionado con algunos aspectos clínicos significativos, como podrían ser la respuesta al tratamiento, la clínica manifestada, o el pronóstico de la enfermedad.

El estado de metilación del promotor del gen MGMT ha sido estudiado como un posible factor de mejor pronóstico, en los casos en los que este gen esté silenciado, ya que se traduce en una mayor y mejor respuesta al tratamiento quimioterápico habitual.

De todas las técnicas que posibilitan el estudio del estado de metilación, se seleccionaron MSP y pirosecuenciación como las herramientas a desarrollar en este trabajo, porque la primera es la de referencia, y la segunda es la que emplearemos con nuestro grupo de pacientes.

Nuestra muestra incluye 48 pacientes con glioblastoma multiforme, diagnosticados entre los años 2012 y 2015; y tratados con el protocolo STUPP.

Se extrajo el DNA tumoral de estos 48 pacientes y a continuación, se procedió con una técnica de Bisulfito, a fin de identificar los restos citosina metilados. Después se llevó a cabo una pirosecuenciación, estudiando cada una de las islas CpG de una región del promotor del gen MGMT, con el fin de calcular el porcentaje de metilación existente en tal segmento.

Con los resultados obtenidos se realizaron tres curvas de supervivencia, variando el punto de corte de porcentaje de metilación, discriminando entre 25%, 35% y 50%. Finalmente, pudimos concluir el trabajo con que no solo el estado de metilación es importante para lograr una mejor o peor respuesta al tratamiento Quimioterápico, sino que el porcentaje de metilación también es altamente importante, existiendo una mayor supervivencia media, en caso de presentar un mayor número de células neoplásicas con islas CpG metiladas.

Glioblastoma multiforme is the most frequent primary intracranial tumour, and it's also the worst prognosis derived tumour in that location, in relation with its high malignance.

The metilation status of MGMT promoter has been linked to a better prognosis, in those cases where the gen is silenced. This situation means a greater and better response to the usual chemotherapy treatment.

Including all tools which could study the metilation status of MGMT, we have choosen MSP and Pyrosequencing to develop the study; the first one because it is the reference technique, and the second one because is the way we will employ with our patients.

Our sample includes 48 patients with glioblastoma multiforme, that it has been diagnosed between 2012 and 2015. All patients were treated with de STUPP protocol.



Firstly, neoplastic DNA was extracted from all the patients included in the study. Then, we applied a bisulphite reaction to identify all cytosine rest that were methylated. Afterwards, we employed pyrosequencing to study every CpG island inside a section of the MGMT promoter. In this way, we could calculate the methylation percentage existent in that section of the promotor.

With the obtained results, we developed three survival curves, employing thee differents cut-off points of methylation percentage: 25%, 35% and 50%.

Finally, we could finish this article with some conclusions. Mainly, that not just the methylation status is important in relation to treatment reponse. The percentage of this methylation is significant too, existing a higher survival in those patients who had a higher methylation percentage.

### **Palabras clave**

Glioblastoma multiforme, epigenética, promotor MGMT, pirosecuenciación, PCR, bisulfito, expresión genética, biología molecular, temozolamida, protocolo STUPP, supervivencia.

### **Introducción**

El glioblastoma multiforme es el tumor intracraneal primario más frecuente. Forma parte del grupo de tumores derivados de los astrocitos; siendo, de éstos, el de pronóstico más sombrío, con una supervivencia media de unos doce meses.

Es característico de este grupo de cánceres, la escasa diferenciación, elevado número de mitosis, necrosis focales y áreas de hemorragia por neovascularización.

En lo relacionado con su tratamiento y su pronóstico, numerosas investigaciones con técnicas de biología molecular, han corroborado la mejor respuesta al tratamiento con fármacos quimioterápicos, en aquellas neoplasias que presentaban metilado el gen MGMT.

En este trabajo, tratamos de exponer una serie de herramientas con el fin de valorar el estado de metilación de dicho gen, así como establecer una comparativa entre los resultados ofrecidos por la técnica convencional hasta la fecha (MSP) y la técnica en experimentación (pirosecuenciación).

### **Material y métodos**

El artículo se estructura en dos partes bien diferenciadas. La primera es una revisión clínica del cáncer, empleando para su desarrollo la información contenida en libros de



texto, atlas radiológicos y artículos recientes sobre el tema (con un filtro de los últimos diez años).

En este sentido, dicha revisión se estructura en varios apartados, que son aspectos epidemiológicos, aspectos anatomopatológicos, localización del cáncer, patogenia, clínica, comportamiento radiológico y tratamiento.

Para la segunda parte, relacionada con epigenética, se utilizó información procedente de varios artículos publicados en Pubmed hasta la fecha, y muestras tisulares del cáncer de 48 pacientes diagnosticados de Glioblastoma multiforme entre 2012 y 2015. La edad media de nuestro cluster de pacientes es de 61,5 años, con un rango de entre 34 años y 79.

En todos los casos, el tratamiento fue común, con el protocolo STUPP (Cirugía máxima posible + radioterapia + Temozolamida). Sí que hubo diferencias en el tratamiento quirúrgico de dicho protocolo, ya que 18 de los pacientes fueron sometidos a una exéresis tumoral completa, 11 lo fueron a una exéresis parcial; y finalmente en los 19 restantes, únicamente fue posible la toma de biopsia (que permitiría una posterior toma de células tumorales para el estudio)

En lo referente a la manipulación del DNA, inicialmente se preservaron las muestras tisulares de los cánceres en parafina. Después, tuvo lugar la extracción del material genético. Posteriormente, con todas las muestras, se procedió con una técnica de Bisulfito, y posteriormente fue llevado a cabo el proceso de pirosecuenciación, donde, a través de un primer par de cebadores (o primers), se identificó el fragmento del promotor que posteriormente se quería amplificar; para esto, se empleó otro cebador, capaz de identificar las islas CpG. En la consiguiente interpretación de resultados, el principio en que se basan éstos, es una diferente energía lumínica en las reacciones derivadas del tratamiento con isletas CpG metiladas, y de las no metiladas.

Finalmente, se construyeron tres curvas de supervivencia, en función del perfil de metilación observado en cada uno de nuestros pacientes, atendiendo a tres diferentes puntos de corte en relación al grado de metilación de las islas metiladas. Para la confección de las tablas de supervivencia, empleamos el parámetro estadístico Log-Rank.



## **Resultados**

### GLIOBLASTOMA MULTIFORME

#### Aspectos epidemiológicos

El glioblastoma es el cáncer más frecuente de los cánceres primarios del sistema nervioso central. Además, dentro de su grupo de astrocitomas, supone el 50-60% del total de éstos; por lo que se trata de una causa frecuente de cáncer, teniendo en cuenta que los tumores astrocitarios son las neoplasias primarias más frecuentes a nivel del SNC.

La incidencia de este cáncer es de 2-3 pacientes/100.000 habitantes cada año, en los países desarrollados. Independientemente de las cifras, que varían desde unas fuentes bibliográficas a otras, sí que es cierto que el aumento en la esperanza de vida, conduce a un aumento significativo de la incidencia.

En relación a la edad, se trata de un cáncer epidemiológicamente más acusado en pacientes de entre 45 y 70 años, independientemente del género (no existen diferencias significativas, en la incidencia entre ambos sexos).

Finalmente, y en términos de mortalidad, merece la pena destacar la fatalidad del pronóstico de los pacientes, ya que la media de supervivencia es alrededor de los doce meses.

El glioblastoma es la forma más grave de cáncer astrocitario. Es el grado más agresivo, con un comportamiento realmente atroz, que en la mayor parte de los casos, ocasiona una muerte próxima a la fecha de diagnóstico.

Este cáncer puede debutar de novo; o puede ser una progresión de un tumor astrocitario de menor grado, por lo que los pacientes deben ser seguidos cuidadosamente.<sup>1</sup>

#### Aspectos anatomopatológicos

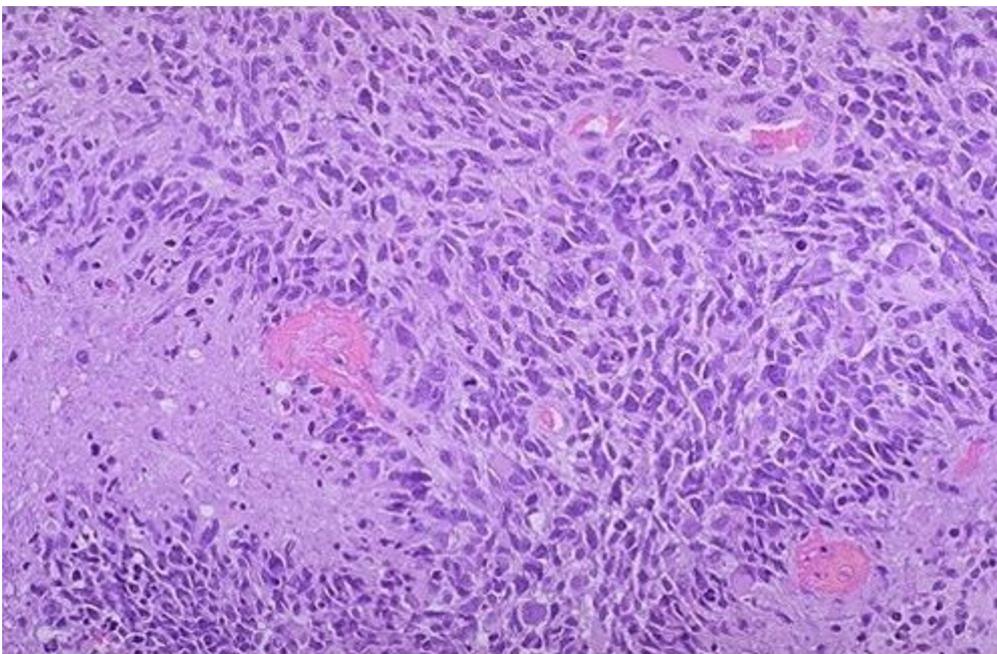
La histología del tumor ofrece hallazgos característicos también, como son un elevado número de mitosis por campo de gran aumento, áreas de neovascularización, áreas de necrosis en empalizada, fenómenos de trombosis e importante heterogeneidad en la muestra de biopsia. Otros hallazgos microscópicos posibles son la presencia de células gigantes multinucleadas, focos con disposición granuloide, células granulares, o células lipidizadas.



La visión macroscópica permite apreciar una lesión irregular, de bordes mal delimitados, de localización variable. No obstante, pese a la variabilidad citada, los glioblastomas asientan frecuentemente en hemisferios cerebrales, siendo infrecuentes, aunque no imposibles, en médula espinal o tronco del encéfalo.

La lesión presenta también heterocromía, ya que alterna áreas grisáceas, otras áreas rojizas y otras amarillas. Además, no es infrecuente la presencia de áreas hemorrágicas en distintos estadios de evolución.

Las imágenes a continuación representan los hallazgos descritos previamente, con respecto a la anatomía patológica<sup>1</sup>



**Glioblastoma multiforme: Histología**

Al microscopio, el glioblastoma se caracteriza por presentar áreas de necrosis difusas, áreas de neovascularización, elevada celularidad, y un importante número de mitosis.

Las células astrocitarias tumorales son muy pleomórficas.



**Glioblastoma multiforme: Visión macroscópica**

Macroscópicamente, puede apreciarse una lesión de gran tamaño (aunque realmente es variable), de aspecto muy irregular, heterogéneo, de bordes mal limitados, y evidentes áreas de necrosis.

Su crecimiento puede invadir estructuras vecinas, como, en este caso, el ventrículo lateral derecho.

### Localización del cáncer

La localización más habitual es a nivel de hemisferios cerebrales, de modo subcortical. Más detalladamente, dentro de los hemisferios cerebrales, no es igual la incidencia en diferentes lóbulos:

- En lóbulo temporal asientan el 31% de los glioblastomas.
- En lóbulo parietal, lo hacen el 24%.
- En lóbulo frontal, asientan el 23%.
- En lóbulo occipital, aparecen el 16%.

Como detalle clínico interesante, la localización típicamente más frecuente es a nivel fronto-temporal, sin existir distinción entre hemisferio derecho o izquierdo.

Por sus características infiltrativas, es frecuente que el glioblastoma afecte más allá de su localización original, invadiendo ganglios de la base, incluso el hemisferio contralateral. En este último caso, no es infrecuente que el cáncer se disemine rápidamente de un hemisferio a otro a través de la sustancia blanca, ofreciendo una imagen simétrica de un lado con respecto del otro<sup>1</sup>.



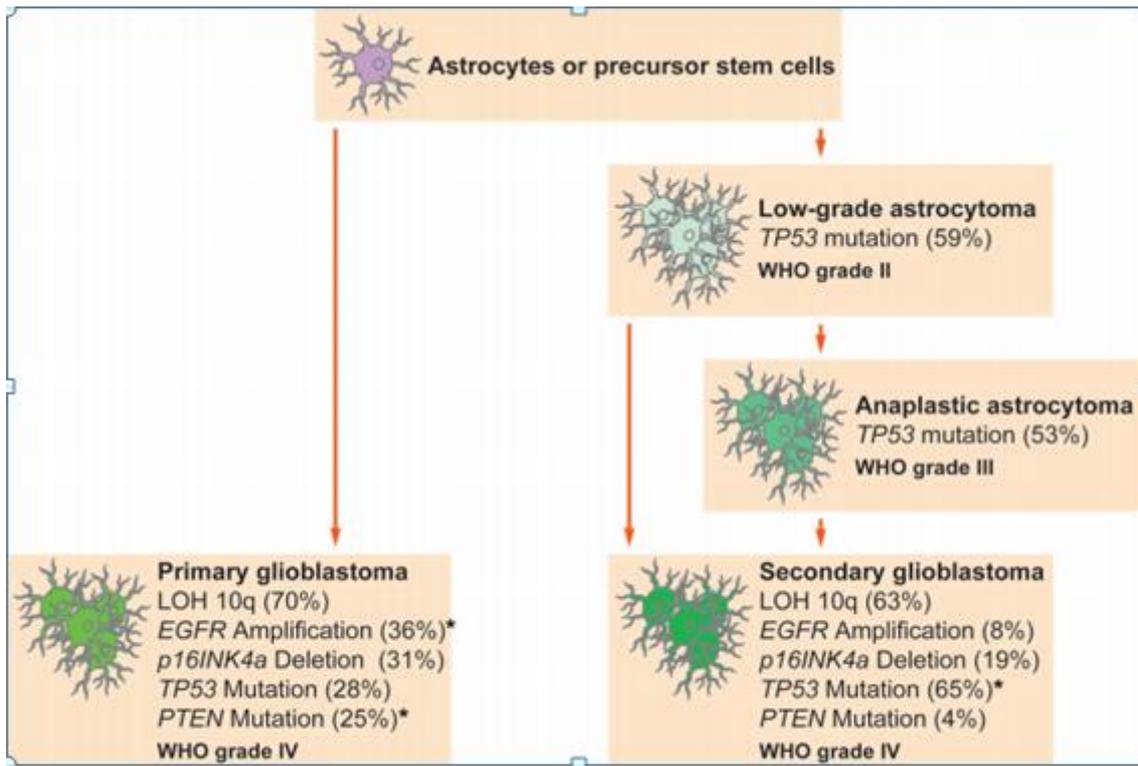
Según estudios recientes, la localización de la neoplasia está estrechamente relacionada con la expresión genética del mismo; así como de la expresión clínica, o la edad media de debut<sup>1</sup>. Para representar este hecho, el artículo de Denicolai E, resumía las localizaciones en cinco, a saber: cortical-frontotemporal, cortical-temporal, periventricular-fronto-temporal, periventricular temporal y periventricular-occipital; basándose en la expresión o falta de expresión, de diez genes diferentes: VEGF, FL4, MET, HGF, CHI3L1, PROM1, NOTCH1, DLL3, PDGFRA y BCAN). Su estudio concluyó con que, basándose en estudios previos que evidenciaban el diferente perfil genético entre glioblastomas corticales, y periventriculares, también podían sugerir que la localización específica también se ve muy influenciada por sus características moleculares<sup>2</sup>

### Patogenia

El desarrollo del glioblastoma obedece fundamentalmente a la activación de oncogenes y la inactivación de antioncogenes. Dentro del primer grupo, los principales genes relacionados son rEGF, rPDGF y MDM2. Dentro de los antioncogenes inactivados, son importantes DCC, p16, TP53, PTEN, RB, y algunas anomalías cromosómicas, como las deleciones o alteraciones en 10p, 10q o 19q.<sup>1</sup>

Anteriormente se apuntaba que el glioblastoma puede aparecer de novo (Glioblastoma multiforme primario), con una historia clínica más súbita y agresiva; o desarrollarse a partir de otros astrocitomas de menor grado (Glioblastoma multiforme secundario). En ambos casos la biología molecular también resulta de interés, ya que la evolución a la forma de peor pronóstico, depende de la acumulación de mutaciones en genes supresores de cáncer y en oncogenes.

Ohmak H, en un estudio sobre las posibilidades genéticas de desarrollar un glioblastoma primario y secundario, logró exponer genes identificados en esta progresión, o en el desarrollo de novo del cáncer.<sup>1,3</sup>



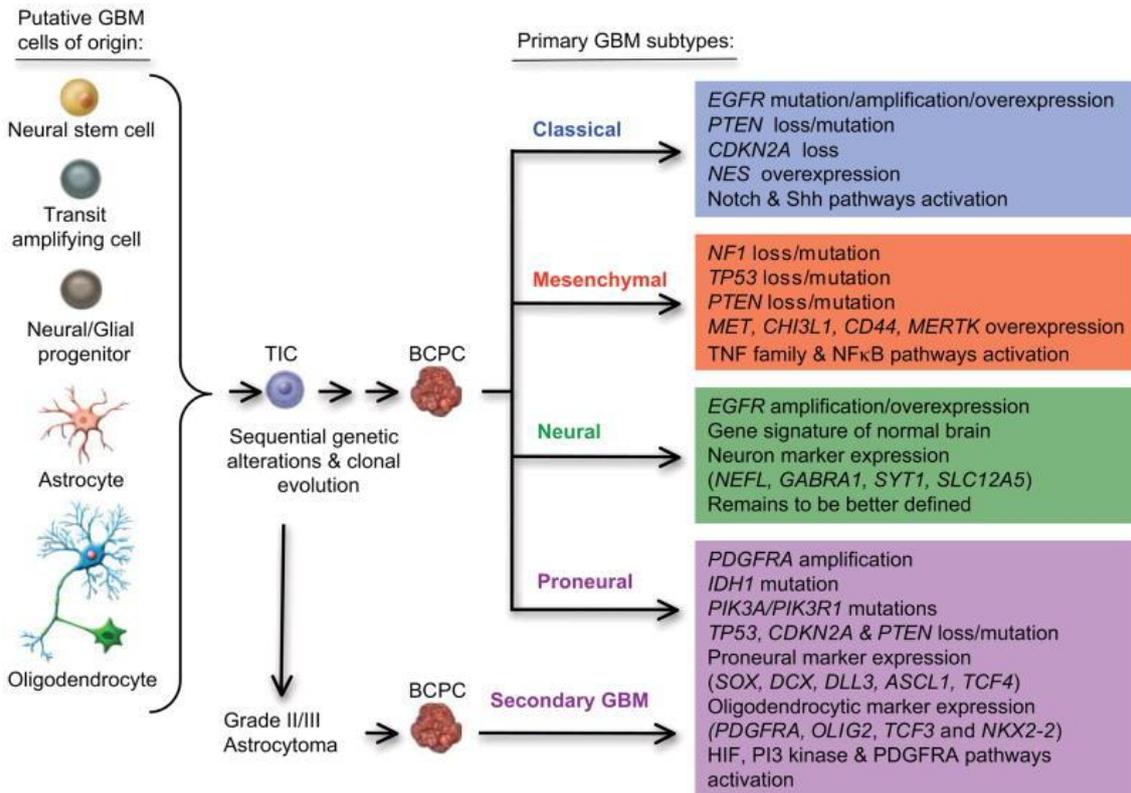
**Patogenia del glioblastoma**

El esquema muestra un resumen del artículo referenciado, donde se puede apreciar el perfil genético que se va adquiriendo de modo progresivo en las formas primarias, y en las secundarias.

Del mismo modo, dentro de los glioblastomas primarios, también hay que volver a destacar la importancia capital de la biología molecular, ya que existen varios subtipos, con diferencias significativas en la respuesta al tratamiento.

En este sentido habría que clasificar estos cánceres de novo, en cuatro estirpes diferentes: clásico, proneural, neural, y mesenquimatoso, en función de su perfil molecular. Algunas de las aberraciones genéticas pueden ser compartidas por varios de estas variedades, sin embargo, hay algunas identificativas de cada un subtipo, como por ejemplo EGFR en el glioblastoma clásico, NF1 en el glioblastoma mesenquimatoso, o PDGFRA/IDH1 en el proneural<sup>4</sup>.

Más detalladamente, el perfil genético de cada una de las estirpes puede verse reflejado en el siguiente gráfico<sup>4</sup>.



Existe una implicación pronóstica y terapéutica como se decía antes, ya que la respuesta al tratamiento no es la misma en todos los casos<sup>5</sup>.

La supervivencia es otro de los aspectos que este artículo considera de interés. Según sus resultados, la probabilidad de supervivencia es de unos 12,2 meses, en el GBM clásico; de 15 meses, tanto en la variante neural como en el mesenquimatoso; y de 16,2 meses en el caso de la variante proneural<sup>5</sup>.

Como resumen de este apartado, podría realizarse la siguiente simplificación: El perfil molecular del cáncer es uno de los aspectos con mayor peso para establecer la estrategia terapéutica, y para estimar el pronóstico del paciente.

### Clínica

Las manifestaciones clínicas que pueden ofrecer estos tumores dependen capitalmente de su localización.

Es necesario destacar que el glioblastoma no ofrece ningún síntoma característico o exclusivo, sino que más bien todos los gliomas ofrecen unos hallazgos similares; si bien sí que es característico en este cáncer el empeoramiento y el deterioro cerebral de rápida progresión.



Existen diferentes mecanismos por los que los tumores gliales pueden producir manifestaciones clínicas, a saber: aumento de presión intracraneal, hasta dar lugar a un síndrome de hipertensión intracraneal; destrucción e invasión de parénquima sano, ocasionando déficits locales; alteración en el equilibrio electroquímico, dando lugar a frecuentes crisis epilépticas; o por compresión de estructuras vasculares, suponiendo lesiones isquémicas secundarias.

La semiología puede agruparse dentro de dos grupos, la general, y la topográfica, dependiente de la localización del cáncer.

El primero de los grupos guarda relación con el fenómeno de hipertensión intracraneal. La cefalea es un hallazgo muy constante en los tumores gliales. Típicamente aparece por la mañana o por la noche, llegando a interrumpir el sueño del paciente. Se trata de un dolor de cabeza intermitente, de intensidad moderada-grave, muy influenciada por los cambios posturales.

Otros síntomas generales son los cambios mentales, como por ejemplo depresiones, trastornos cognitivos, y deterioro progresivo de la memoria reciente y de otras funciones superiores. Estos síntomas, a pesar de ser generales, están muy condicionados por la localización de la neoplasia, ya que son especialmente habituales en gliomas de localización frontal, temporal, o próximos al cuerpo calloso.

Los trastornos del lenguaje también son dependientes de la localización; de modo que en caso de localizarse en el hemisferio dominante, no es infrecuente el desarrollo de algún tipo de afasia.

El edema papilar es un hallazgo clínico muy característico del síndrome de hipertensión intracraneal que puede aparecer hasta en la mitad de los pacientes con neoplasia intracraneal.

También es posible el desarrollo de clínica visual, como consecuencia de afectación directa de músculos oculomotores, por afectación de nervios y vías implicados en la visión; o por implicación de corteza cerebral visual.

Otros síntomas que se pueden describir como generales, son alteraciones motoras, sensitivas o alteraciones en la marcha.

Las crisis epilépticas son un fenómeno también muy constante (aunque son más comunes en los tumores de bajo grado de malignidad). Típicamente se manifiestan en



formas de crisis focales (con afectación tanto motora como sensitiva, con movimientos estereotipados). La presencia y las características del aura que puede acompañar a las crisis, depende notablemente de la localización del cáncer. Por ejemplo, en caso de localizarse en lóbulo occipital, será frecuente que las crisis se acompañen de aura visual.

Náuseas y vómitos también son síntomas muy habituales. Forman parte del síndrome de hipertensión intracraneal, y suelen acompañar a la cefalea. De un modo menos frecuente, los tumores de fosa posterior pueden producir náuseas y vómitos por compresión de centros eméticos, y no por aumento de la presión intracraneal. También hay que destacar que es posible que el vómito se produzca sin náuseas previas, lo que comúnmente se llama vómito en escopetazo.

Existen también hallazgos clínicos que implican que la neoplasia está en estado avanzado, y traducen un peor pronóstico de la enfermedad, como por ejemplo bradicardia, hipertensión arterial o úlcera de Cushing, que podría responsabilizarse de fenómenos de sangrados gastrointestinales masivos.

Finalmente, el último de los hallazgos clínicos generales que describiré es la disfunción endocrinológica, por afectación del eje hipotálamo-hipofisario.

El otro grupo semiológico es el relacionado con la localización del tumor. La sintomatología depende del área cerebral implicada. Así, por ejemplo, en tumores de localización frontal, es habitual la presencia de alteraciones cognitivas; en tumores localizados en región parietal, pueden aparecer trastornos sensitivos o hemianopsia homónima contralateral; los tumores que se localizan en la parte posterior parietal, pueden dar lugar al síndrome de Gertsman, caracterizado por confusión derecha-izquierda, acalculia, alexia, agrafia y agnosia digital. Los tumores de localización occipital suelen producir manifestaciones visuales; y finalmente, los de localización temporal, se caracterizan por producir crisis epilépticas focales de componente motor y sensitivo, y alteración en memoria y atención.

Aunque es cierto que no hay manifestaciones propias, o más características del glioblastoma; sí que es típica una historia clínica. Estos cánceres pueden debutar con manifestaciones generales y crisis convulsivas, en los meses previos al diagnóstico. Después, por isquemia, hemorragia, necrosis, o destrucción tisular, desarrollarán un cuadro más específico<sup>1</sup>.

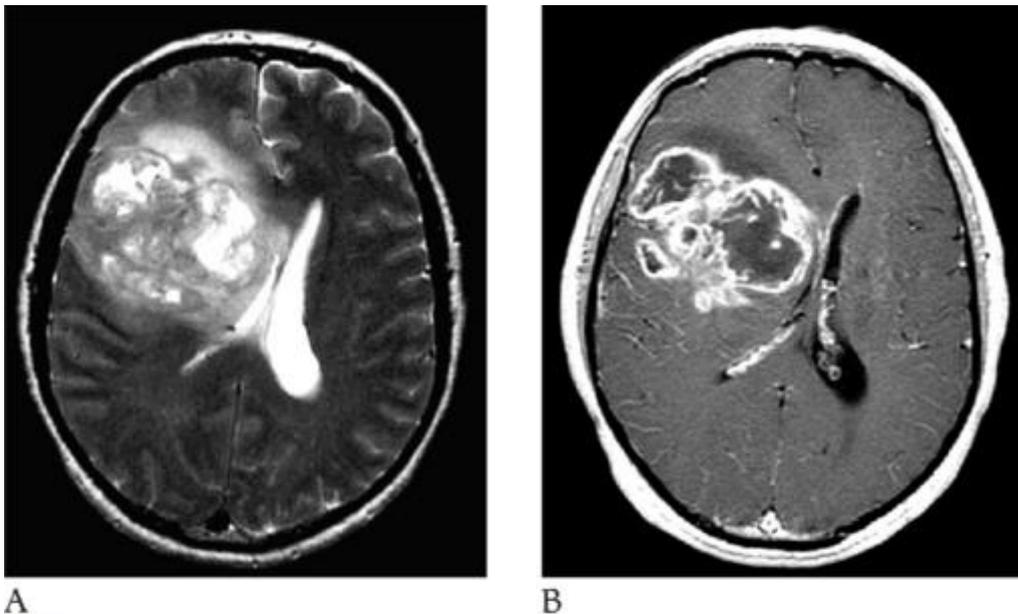


### Comportamiento radiológico

La herramienta fundamental para el estudio de todos los glioblastomas es la Resonancia Magnética Nuclear, a través de la cual es posible apreciar sus hallagos más característicos, pudiendo resumirse como una masa heterogénea, con gran edema vasogénico y efecto masa, asociados.

La heterogeneidad se correlaciona muy bien con la histopatología, y se debe a la alternancia entre áreas sólidas de hiper celularidad, con otras áreas de hemorragia, áreas de isquemia, áreas de neovascularización y áreas necrótico-quísticas.

Para precisar la identificación de estos fenómenos es más útil la secuencia T2 de RM. En ésta, las áreas de hiper celularidad se muestran hiperintensas, las áreas de necrosis, son hipointensas en caso de corresponder a fase sólida de necrosis; o hiperintensas, en caso de tratarse de estado de licuefacción, lo que correspondería a líquido necrótico; y las áreas hemorrágicas, son variables, en dependencia del estadio cronológico de las lesiones tanto en T1 como en T2<sup>1</sup>.

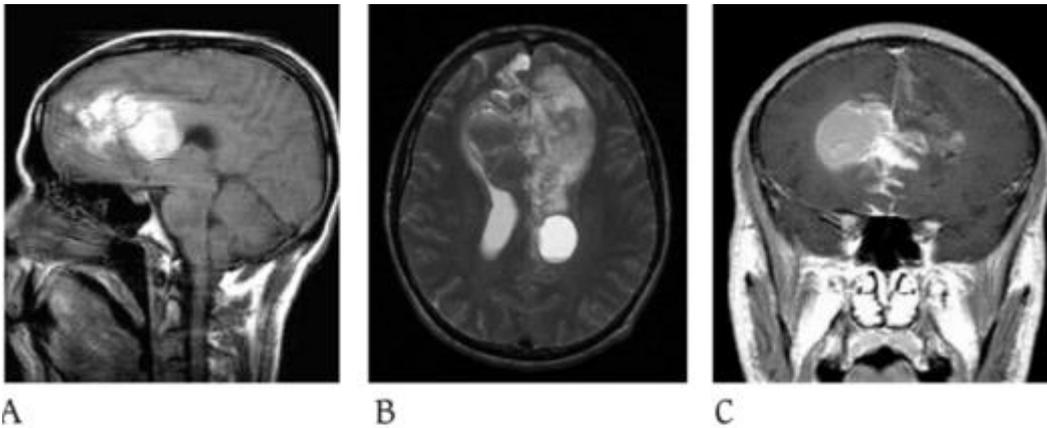


**RMN:** Glioblastoma. **A:** Secuencias de RM potenciadas en T2. **B:** Secuencia de RM potenciada en T1 con contraste. Se aprecia una voluminosa y heterogénea tumoración frontal. Se alternan áreas sólidas hipointensas en T2 (**A**) y parcialmente realzadas con contraste (**B**) con zonas necrótico quísticas, marcadamente hiperintensas en T2 (**A**) y sin realce (**B**). Obsérvese también el fino realce de la pared medial del ventrículo lateral izquierdo, que sugiere extensión subependimaria (**B**). Existe edema vasogénico peritumoral (**A, B**) y un significativo efecto de masa sobre el parénquima, sistema ventricular y línea media (**A, B**).

Las áreas de neovascularización, características del glioblastoma multiforme, se pueden apreciar en todas las secuencias de RMN, como estructuras lineales. Pueden



manifestarse como estructuras serpentiformes, carentes de señal en ninguna de las secuencias<sup>1</sup>.

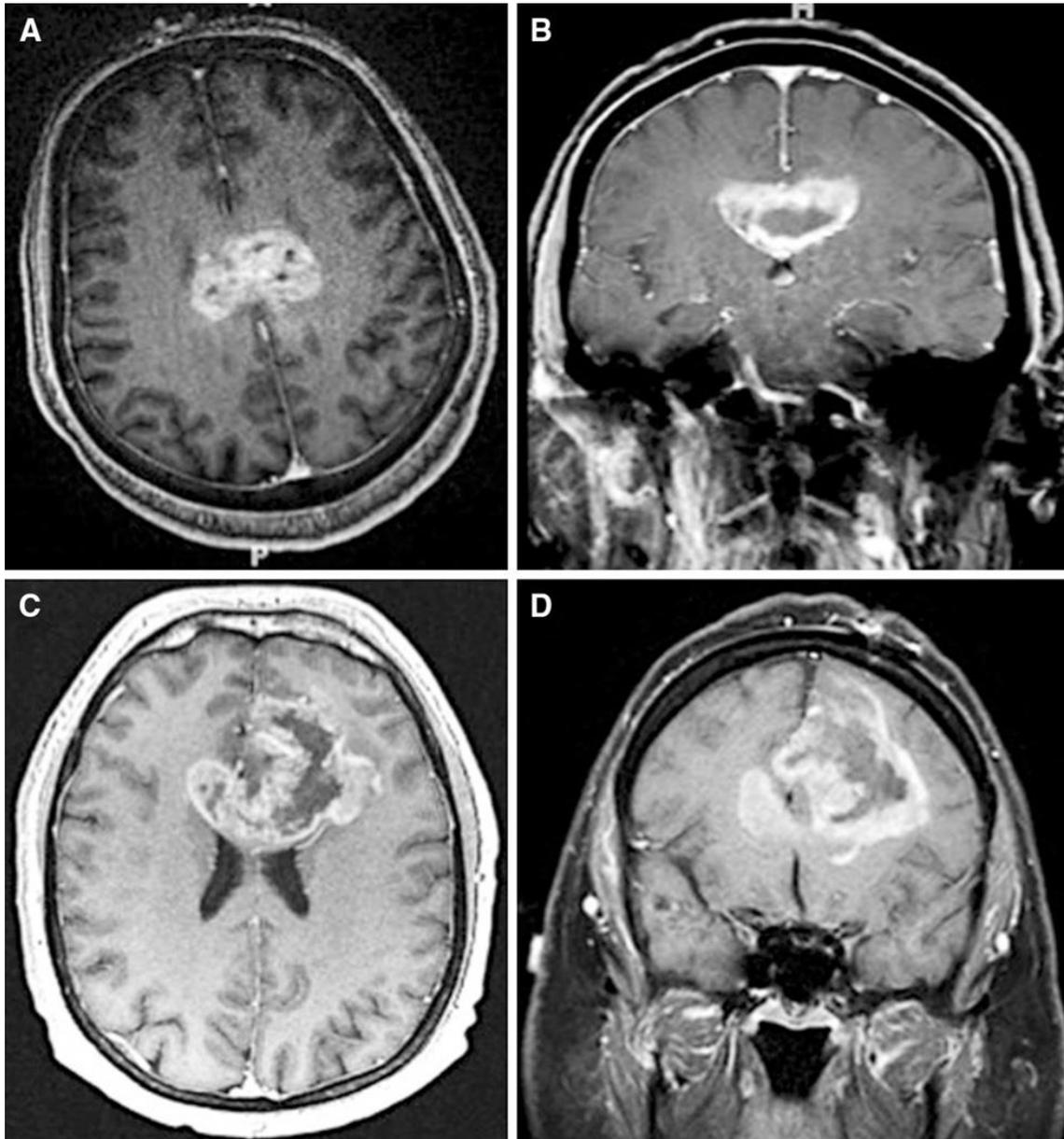


**RMN:** Glioblastoma con cambios hemorrágicos. **A:** Imagen sagital potenciadas en T1. **B:** Imagen axial potenciada en T2. **C:** Imagen axial potenciada en T1 con contraste. Se aprecia una voluminosa tumoración que se invade el cuerpo caloso y se extiende hacia ambos lóbulos frontales, con morfología "en alas de mariposa" (**B**). Las áreas de sangrado intratumoral son muy prominentes y presentan marcada hiperintensidad de señal en T1 (**A**) e hipointensidad en T2 (**B**), sugiriendo menos de dos semanas de evolución. En T2 también se aprecia un área serpinginosa de vacío de señal que refleja la presencia de neovascularización y un quiste hemorrágico con pequeño nivel líquido en su interior (**B**). Existe realce de la superficie de los surcos en la región frontal basal subyacente al tumor (**C**), indicando diseminación leptomenígea.

La inoculación de contraste es especialmente útil en T1<sup>1</sup>, ya que permite apreciar la imagen típica de captación anular. En esta imagen, se puede apreciar una lesión central, hipointensa; y una periferia hiperintensa, como consecuencia de la extravasación del contraste o el sangrado de la lesión (en términos prácticos, por alteración de la barrera hematoencefálica)

Finalmente, es posible identificar aspectos relacionados con diseminación intracraneal del glioblastoma, como por ejemplo la imagen en alas de mariposa<sup>6</sup>; o metástasis locales a nivel subaracnoideo o subependimario.

En el caso de las metástasis locales, es posible que los focos tumorales presenten conexiones entre ellos, llamándose glioblastomas multifocales; o no tenerlas, siendo glioblastomas multicéntricos. Un estudio reciente demostró que las masas tumorales multifocales en el momento del diagnóstico, tiene mejor pronóstico de supervivencia que aquellos con lesiones multicéntricas<sup>7</sup>.



**Imagen de alas de mariposa:** Diseminación del glioblastoma al lóbulo contralateral a través del cuerpo calloso<sup>6</sup>

Como último comentario a destacar en el radiodiagnóstico, lo más importante en este sentido es que para la identificación y caracterización del glioblastoma, la herramienta fundamental es la resonancia magnética nuclear, en T1 con administración de contraste, y en T2.

### Tratamiento

El tratamiento más adecuado del glioblastoma multiforme se compone de cirugía (exéresis completa de tumor, sin márgenes de seguridad, ya que no suele existir tales márgenes en los glioblastomas, por lo irregular de sus límites y la alta capacidad infiltrativa de los tejidos sanos circundantes), con radioterapia posterior (Administración



de una dosis total de 60 Gy, a razón de entre 1,8 y 2 Gy cada día), y Quimioterapia con temozolamida. Estos tres componentes forman el protocolo STUPP, actualmente referencia en el tratamiento del glioblastoma multiforme.

El volumen a irradiar con la radioterapia es limitado, abarcando el tumor y un margen de unos 2 cm alrededor.

Esta Radioterapia postquirúrgica debe comenzar a las 2-3 semanas de la intervención.

Quimioterapia es también una herramienta vital en el tratamiento del glioblastoma. Al contrario que en los gliomas de bajo grado, donde se trata más bien de una técnica adyuvante; en el glioblastoma, forma parte del tratamiento inicial, ya que con la cirugía, no es segura la exéresis del total de las células neoplásicas.

En la actualidad, el tratamiento quimioterápico que mejor resultados ha ofrecido es el empleo de temozolamida, después de la cirugía y de radioterapia<sup>1,13</sup>.

## EPIGENÉTICA

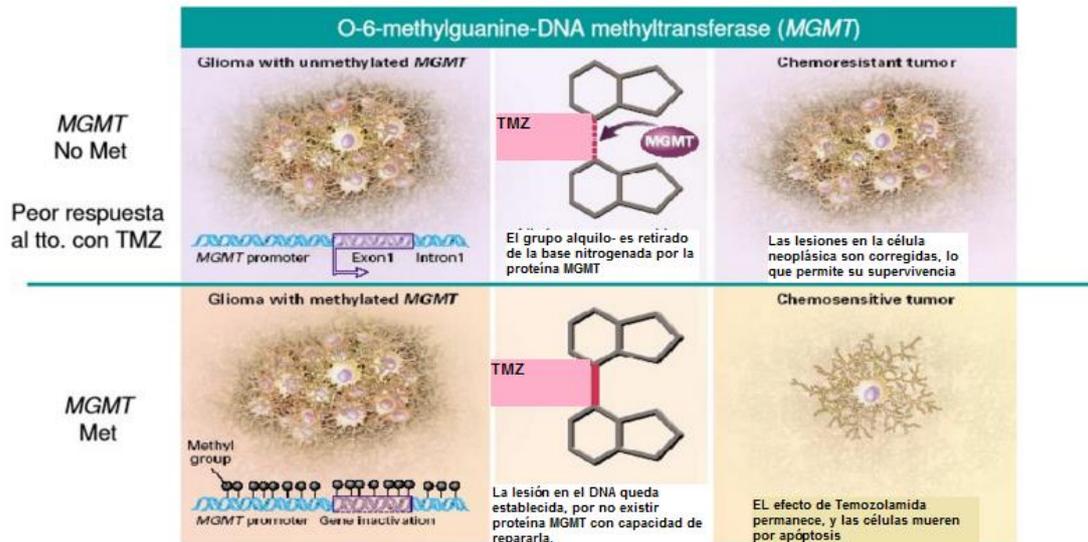
Epigenética es un concepto moderno dentro de la genética. Hace referencia a todos los factores no genéticos, que influyen en la expresión génica. Los mecanismos epigenéticos son cambios heredables en la actividad génica, sin existir cambios en la secuencia de nucleótidos.

Uno de los mecanismos de la epigenética es la metilación del DNA, consistente en la adición de grupos metil o hidroximetil en posición C5 de la base citosina. En este momento es útil presentar las islas CpGs, muy relacionadas con la expresión de los genes, y que, como es lógico pensar, no se distribuyen de modo aleatorio, sino que se localizan fundamentalmente en las regiones promotoras de los genes.

En relación ya con el motivo del trabajo, los antineoplásicos de la familia de las nitrosiureas, como temozolamida, son responsables de inducir la aparición de grupos alquilo en la posición O6 de la base guanina, del DNA de las células tumorales. Este hecho permite la separación de las dos hebras del DNA, y su consiguiente apoptosis. Aquí es donde interviene la proteína que codifica MGMT (O6 Metilguanina-ADN metil transferasa), capaz de reparar las lesiones en el DNA de las células cancerosas (Es decir, de retirar los grupos alquilo), permitiendo la supervivencia de las células malignas. Es por esto por lo que el pronóstico de los pacientes con glioblastoma multiforme, es más favorable en caso de presentar metilado este gen. Se conoce ya que este gen reparador de lesiones se localiza en el cromosoma 10, en humanos. En las células



sanas, se trata de un producto génico de gran interés, ya que inhibe el asentamiento de anomalías genéticas inducidas por factores extragénicos. También hace lo propio, como se decía antes, en células neoplásicas, por lo que la presencia de mutaciones en el promotor del gen, en células tumorales, supone un gran marcador pronóstico positivo, para una respuesta más beneficiosa al tratamiento con Temozolamida<sup>8</sup>.



### Técnicas de estudio del DNA: Análisis de metilación<sup>9</sup>

Antes de comenzar con el manejo de las diferentes técnicas a emplear, para estudiar el estado de metilación del DNA; debe explicarse el método con el que se tratará el DNA, a fin de facilitar la identificación de dichas regiones metiladas. Se trata de la técnica de bisulfito. Este procedimiento es el paso inicial en varias de las técnicas que se estudiarán a continuación. En lo que a nosotros compete, también es la técnica que ha de realizarse antes de la pirosecuenciación; y en el caso del estudio de Hegi, la que se llevó a cabo antes de la MSP (Por tanto, es un paso común en ambos procedimientos).

La técnica bisulfito consiste en hacer reaccionar la muestra de DNA a estudiar con bisulfito (NaHSO<sub>3</sub>). Este ion es capaz de producir una deaminación de los residuos citosina, en uracilo (que por secuenciación, serán leídos como restos timina); pero no así con los residuos metilados de citosina, que seguirán siendo leídos como citosina. A continuación, habrá que comparar la secuencia obtenida, con una de control que no ha sido sometida a la acción del bisulfito.

A continuación, hay que proceder con una de las técnicas para el estudio del DNA, o bien MSP, o bien pirosecuenciación (la primera, por ser la de referencia; y la segunda, por ser la escogida en el estudio de nuestros 48 pacientes)



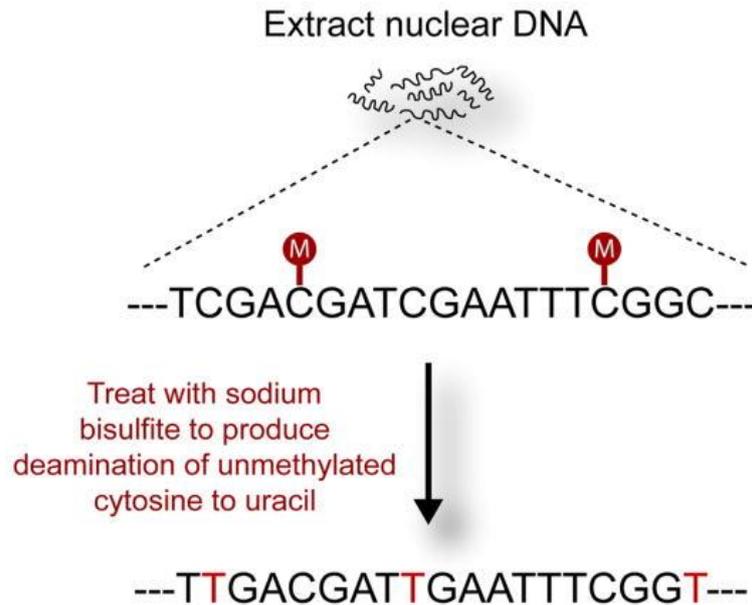
Esta herramienta puede presentar ciertas limitaciones, como por ejemplo la conversión incompleta, donde no todas las citosinas no metiladas son convertidas en uracilo, sino que también son interpretadas como citosina, lo que sugeriría que la base estaba metilada, y se producirá un falso positivo en esa isla CpG.

Es crucial asegurarse por tanto de la conversión de todas las bases citosina no metiladas en uracilo, por esto resulta fundamental llevar a cabo un control cuidadoso de las reacciones mediadas por bisulfitos, de la temperatura de la reacción y de las concentraciones de sales.

Otra limitación importante, es que la necesidad de concentraciones determinadas y altas de sales, la temperatura empleada, y el largo tiempo de incubación, pueden promover la degradación del DNA de la muestra, de modo paralelo a la separación de las hebras; lo que puede suponer posteriores errores en la amplificación con PCR.

Finalmente, la última de las limitaciones importantes es la desulfonación incompleta de pirimidinas, lo que afectaría negativamente a la posterior acción de la DNA polimerasa en la amplificación, que será incapaz de replicar adecuadamente el molde de la cadena.

Esta técnica no solo puede emplearse para estudiar algunas regiones que se consideren importantes, sino que también puede llevarse a cabo un estudio de todo el genoma, al igual que en las técnicas del punto 1; con el beneficio derivado añadido de la acción de bisulfitos. No obstante, existen problemas derivados de esto, como son el coste, las importantes dificultades de interpretación (resultantes de estudiar completamente un genoma únicamente compuesto por tres bases), o la gran cantidad de muestra necesaria para el estudio.



15

Estas limitaciones pueden aligerarse de algún modo con las técnicas RRBS (Reduced representation bisulfite sequencing), donde únicamente se secuenciarán fracciones aisladas del genoma. No obstante, para llevar a cabo esto hay que conocer previamente qué regiones son las que se han de aislar. Para ello, las regiones ricas en islas CpG son identificadas mediante enzimas digestivas (cortan estas regiones, en las que se incluyen nucleótidos metilados y no metilados). Posteriormente, son sometidas a la acción del bisulfito, como se escribía anteriormente. Los beneficios de esta técnica reducida, es que permiten aislar hasta el 85% de las islas GpC del genoma humano, en una muestra relativamente pequeña.

Ahora ya sí que se expondrán algunas de las posibilidades existentes en lo referente al estudio del estado de metilación del DNA, basando nuestro interés, como ya se mencionaba anteriormente, en MSP y pirosecuenciación.

Existen algunos aspectos diferenciales para la elección de una técnica y no otras, como son la calidad y cantidad de muestra de material genético disponible, la robustez y sencillez a buscar, objetivos del estudio; requerimientos del estudio en términos de sensibilidad y especificidad; disponibilidad de sistemas de análisis e interpretación de datos; disponibilidad de equipos y profesionales; y costes.

Podemos clasificar el grueso de las técnicas en dos grupos: las que estudian el perfil de metilación de todo el genoma; y las que estudian regiones diferenciales del genoma (éstas últimas son las más importantes en este trabajo)



1. Determinación del perfil de metilación de todo el genoma. Útil en los casos en los que no se conocen los genes candidatos a estudio. Dentro de las técnicas que se incluyen en este grupo:
  - a. HPLC-UV (High performance liquid chromatography- Ultraviolet). Brevemente, consiste en una escisión de todo el DNA, a sus bases nitrogenadas; posterior separación de las bases metiladas a través de cromatografía; y final recuento de las mismas.
  - b. LC-MS/MS (Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry). Similar a HPLC-UV, con la salvedad de que permite el estudio de metilación en muestras menos cuantiosas, o de peor calidad.
  - c. Técnicas basadas en ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Existen varios kits que permiten una estimación rápida, pero grosera, del estado de metilación. De un modo simplista, la muestra de DNA es capturada en una lámina ELISA; y, a través de los siguientes tres pasos, es posible identificar las bases metiladas: 1. Primer anticuerpo contra las bases citosina metiladas; 2. Segundo anticuerpo que “etiqueta” dichas bases; 3. Aplicación de técnicas colorimétricas o fluorométricas, para identificar dichas bases.
  - d. LINE1 (long interspersed nuclear elements) + Pirosecuenciación. Con ello, se fragmenta el DNA en pequeños fragmentos, sobre los que posteriormente se emplea pirosecuenciación para evaluar el estado de metilación de los genes.
  - e. AFLP y RFLP (Amplification fragment length polymorphism y Restriction fragment length polymorphism). Se trata de técnicas basadas en la amplificación de polimorfismos con PCR (Polymerase chain reaction). Se trata de técnicas en vías de extinción, porque únicamente permiten estimar una proporción muy pobre de metilación.
  - f. LUMA (Luminometric methylation assay). Se lleva a cabo mediante dos digestiones enzimáticas del DNA, a través de enzimas sensibles a la metilación (HpaII y MspI), con posterior pirosecuencia de los fragmentos resultantes.



Todos los anteriores, tienen tendencia a infraestimar o a sobreestimar el número de metilaciones presentes en las muestras de DNA; sin embargo, LINE1 se ha demostrado como el que mejor correlaciona sus hallazgos con la realidad.

2. Estudio del grado de metilación de genes que interesan. En este caso sí que se conocen los genes implicados.

a. Bead Array. Puede personalizarse para el estudio de hasta 384 regiones CpG.

b. Pirosecuenciación es una de las herramientas más importantes en cuanto al motivo de este estudio, ya que se trata de la técnica con la que se quiere comparar el método empleado en el estudio de Hegi (MSP). Se estudia cada uno de los clones por separado, lo que hace este método especialmente interesante para los estudios de cáncer, donde característicamente, las células neoplásicas tienen patrones de metilación diferentes en sus loci de interés.

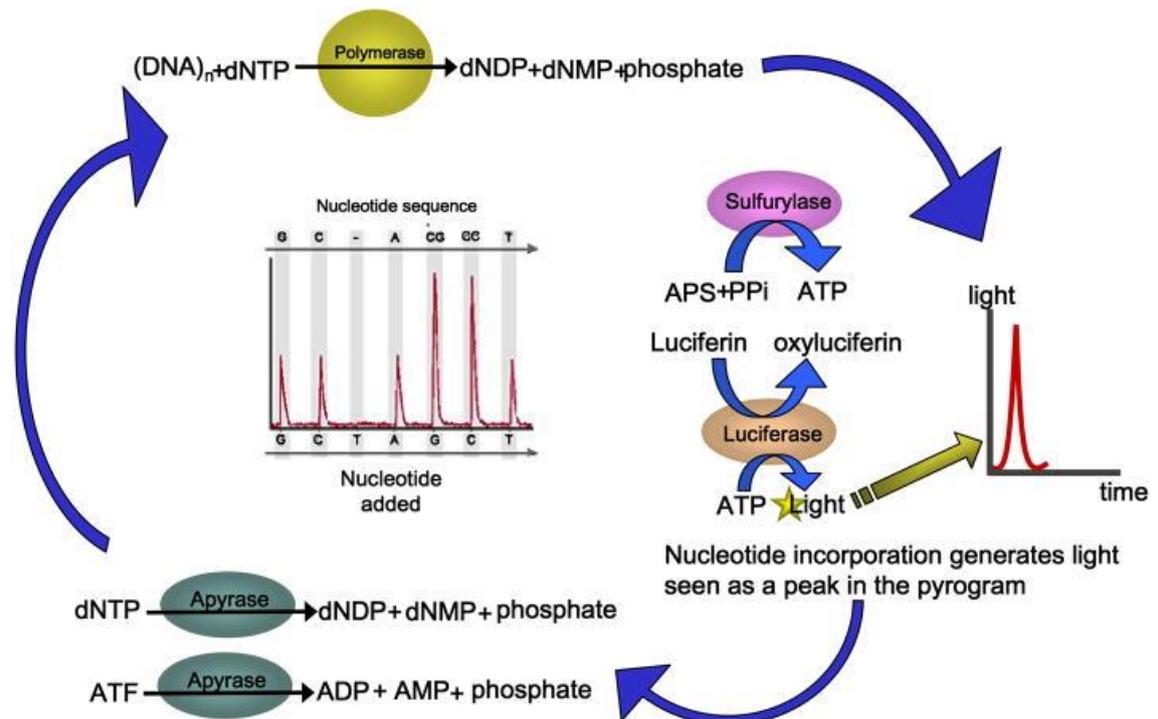
Pirosecuenciación es un método de secuenciación del DNA en tiempo real basado en la liberación de pirofosfatos resultante de la actividad de polimerización del DNA a partir de sus dNTPs.

El procedimiento consiste, primeramente, en que, a partir de una molécula monocatenaria de DNA, obtenida tras la técnica de disulfito, se aísla un fragmento pequeño del promotor del gen de interés (para este aislamiento será necesario disponer de un primer par de "primers"). Tras este aislamiento, sobre este fragmento del genoma, actuará un segundo cebador, capaz de identificar las regiones CpG. La identificación por este segundo cebador conllevará una amplificación de dichas secuencias. Para llevar a cabo la posterior pirosecuenciación, que es realmente lo que nos permite interpretar el estado de metilación, son requeridos los cuatro dNTPs, la DNA polimerasa, enzima sulfurilasa (Su sustrato es adenosina-5'-folfosulfato), enzima luciferasa (y su sustrato, luciferina) y apirasa. A medida que se va produciendo la reacción, va sintetizándose una cadena complementaria a la estudiada, que a su vez va siendo estudiada mediante un pirograma (a través de picos de señal), con lo que se determina la secuencia. Durante el proceso, el primer paso, se van incorporando dNTPs complementarios a la hebra molde, con una



liberación de pirofosfato en cada incorporación. Este pirofosfato, es convertido a ATP a través de la ATP sulfurilasa. Finalmente, este ATP empleado, es empleado para oxidar luciferina a oxiluciferina, a través de la enzima luciferasa de luciérnaga, emitiéndose una radiación. Finalmente, esta radiación es captada mediante una cámara, que representa el número de fotones recibidos a través de un pico en el picograma. La utilidad de la enzima apirasa es eliminar un dNTP añadido, en caso de que no sea realmente el complementario de la cadena molde.

El principio básico es la diferencia de energía lumínica derivada de la incorporación de nucleótidos, en función de si el complementario es leído como citosina (implicaría metilación) o como timina (implicaría que la base no está metilada)



16

- c. PCR específica para bases metiladas. Emplea también DNA procedente de conversión bisulfito.

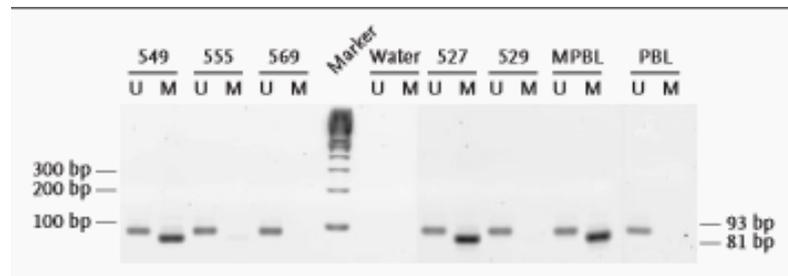
En su variante en tiempo real, es necesario el desarrollo de dos primers, uno para el reconocimiento de las bases metiladas; y otro para el de las no metiladas. De este modo, en función del número de islas CpG que se reconozcan por los primers sensibles a isletas metiladas, se emitirá una señal. Así, en los resultados, podremos observar una columna correspondiente a metilación (número de metilaciones que sobrepasar



un umbral predeterminado) y una columna de no metilación. Por esto, se tiene un resultado dicotómico: metilación SI o metilación NO.

La MSP es la herramienta básica en el estudio de Hegi. Se basa en la metilación-sensible a la reacción en cadena de la polimerasa. También en esta variante de PCR, es necesario el empleo de dos primers diferentes, uno para identificar regiones metiladas, y otro para hacer lo propio con las no metiladas.

Con el sistema PCR, únicamente se obtienen resultados dicotómicos, que dice si un paciente presenta o no metilado el gen, un función de si hay señal en la región de metilación, o no la hay; pero no ofrece hallazgos cuantitativos, como los que sí ofrece la pirosecuenciación.



Estos fueron algunos de los resultados del estudio de Hegi con MSP.

Se emplearon varios controles. El control negativo de la reacción en cadena de la polimerasa se realizó con agua, donde, evidentemente, no habría señal ni de metilación ni de no metilación.

El control de no metilación se realizó con linfocitos de sangre periférica, que únicamente ofrecerían señal en la región no metilada.

El control de la metilación, se realizó con linfocitos modificados enzimáticamente, dando una intensa señal en la región de metilación.

Finalmente, en vista de los resultados anteriores, las muestras 549 y 527 corresponden a cánceres con el MGMT silenciado; y las muestras 555, 569 y 529, se relacionan con cánceres con el MGMT sin metilar.

- d. PCR con calor de alta resolución. Básicamente, se basa en el hecho de que la temperatura de fundimiento para la separación de citosina es mayor para regiones PCR previamente metiladas, que para las no metiladas.
- e. PCR-COLD para identificación de regiones no metiladas. Su principio es simple, ya que consiste en estudiar la temperatura a la que se desnaturalizan las regiones, de modo que únicamente persistan las no metiladas.



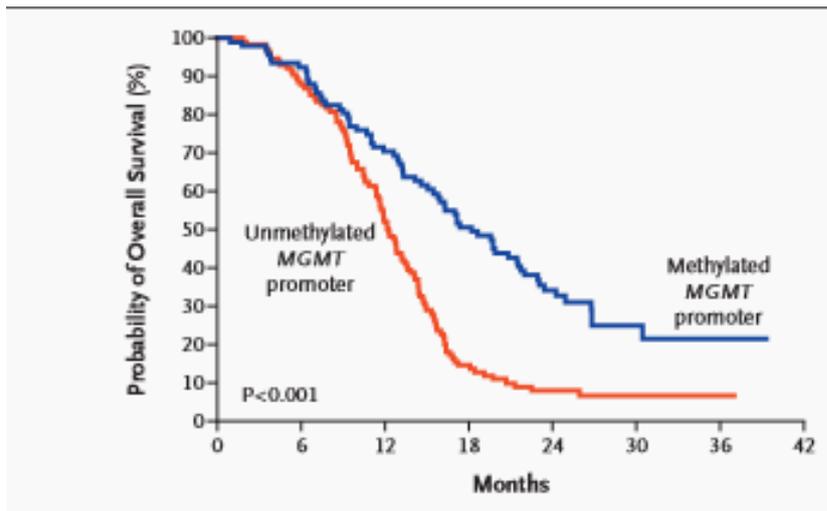
Finalmente, es importante para este trabajo conocer y saber discriminar los resultados ofrecidos por dos técnicas en cuestión, la que se realiza de modo sistemático, que es PCR (fundamentalmente MSP) y pirosecuenciación, que es la técnica experimental. La diferencia fundamental es que la primera, únicamente nos puede ofrecer aspectos cualitativos, es decir, si existe o no existe metilación. La segunda, es capaz de cuantificarnos tal metilación, puede ofrecer el porcentaje de metilaciones de nuestras muestras, del total de islas CpG que hayamos estudiado.

La primera fase es común en ambas técnicas, y consiste en la secuenciación con bisulfito. Así, de este modo, en nuestras muestras, las bases nitrogenadas citosina que no están metiladas, pasarán a convertirse en uracilo (y serán interpretadas posteriormente, tras diversas amplificaciones, como restos timina). Esto no ocurrirá con las bases citosina metiladas, que seguirán siendo interpretadas como citosina.

Mediante MSP, ahora se dispondrá de dos pares de primers (cebadores), unos para la secuencia metilada, y otros para la secuencia no metilada. Posteriormente, debe estudiarse cada una de las muestras mediante los dos sets. En el estudio de Hegi, se emplearon varios controles: Agua para el control negativo de la reacción en cadena de la polimerasa, linfocitos de sangre periférica para el control negativo de metilación; y linfocitos modificados enzimáticamente para el control positivo de la metilación, Finalmente, el estudio mediante esta técnica nos permitirá hacer una discriminación entre metilación SI, o metilación NO.

La alternativa que empleamos nosotros es pirosecuenciación, que se basa en el hecho de que los tumores son diferentes en cuanto a su perfil molecular, entre los diferentes pacientes, y en que, dentro del mismo tumor, existe heterogeneidad genética entre las células. Por ello, empleamos inicialmente un par de primers, con el fin de identificar la región que interesa estudiar. Posteriormente se emplea un segundo cebador en este fragmento del DNA, destinado a identificar las regiones CpG, y a promover la amplificación de dichas regiones. De este modo es posible estudiar, el estado de todas las regiones CpG del fragmento escogido del promotor. Durante la señalización de la energía liberada, nos basaremos en el hecho físico de la diferencia de señal procedente de la incorporación de bases, existente entre islas CpG metiladas, e islas no metiladas.



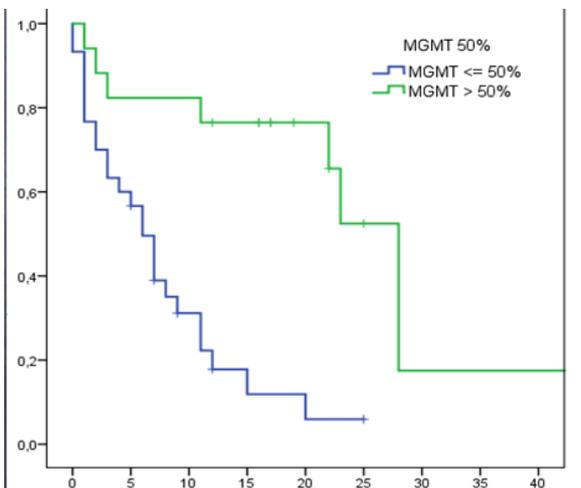
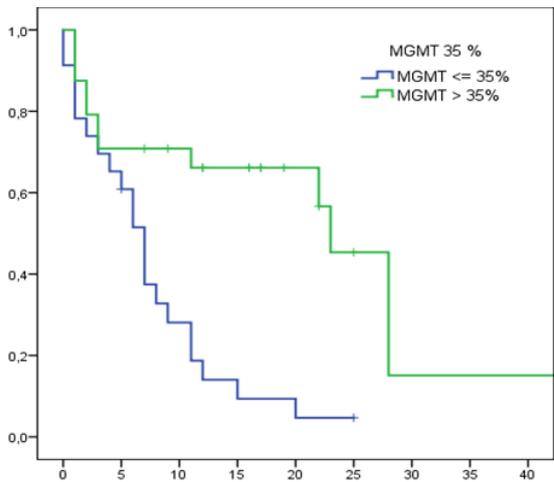
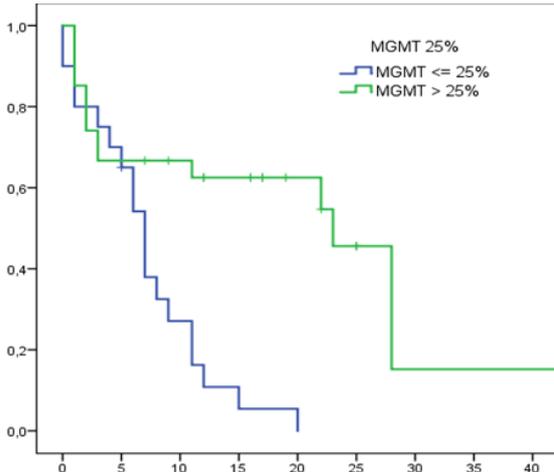


En nuestro estudio particular, empleamos pirosecuenciación sobre cada uno de los 48 tumores, para valorar el perfil de metilación correspondiente a cada uno.

#### Resultados del manejo del DNA neoplásico de nuestros pacientes

Tras la obtención de resultados, y con éstos, se construyeron tablas de supervivencia en función del punto de corte escogido en cuanto al porcentaje de islas estudiadas metiladas.

- a. El primer punto de corte fue 25%. De este modo, y con una  $p < 0.001$ :
  - 20 pacientes presentaban un porcentaje de metilación inferior a 25%. La supervivencia media de estos pacientes fue de 7 meses.
  - 28 pacientes presentaban un porcentaje de metilación superior a 25%. La supervivencia media de este grupo fue de 23 meses.
- b. El segundo punto de corte fue 35%. Igualmente, con una  $p < 0.001$ :
  - 23 pacientes presentaban un porcentaje de metilaciones de CpG inferior al 35%. La supervivencia media de este grupo fue de 7 meses.
  - 25 pacientes presentaban un porcentaje de metilación superior al 35%. La supervivencia de este grupo fue de 23 meses.
- c. Finalmente, el último punto de corte es 50%. También con una  $p < 0.001$ :
  - 30 de los 48 casos, presentaban un porcentaje de metilación inferior al 50%. La supervivencia media en este grupo fue de 6 meses.
  - Los 18 pacientes restantes presentaban un perfil de metilación superior a 50%. En este grupo, la supervivencia media fue de 28 meses.



## **Discusión**

Este apartado es una aplicación práctica de los conocimientos de pirosecuenciación a nuestro tema en cuestión, el glioblastoma. Existen diversas regiones CpG en el promotor del gen MGMT, cuya metilación presenta mayor peso, en lo relacionado al silenciamiento del gen.



Basándonos en varios estudios existentes, se han identificado potenciales regiones CpG críticas para la expresión del gen, y por ende, su metilación se relaciona con silenciamiento del gen.

El gen promotor de MGMT presenta 98 islotes CpG, y desafortunadamente, en todos los estudios hay una gran variabilidad y heterogeneidad en el perfil de metilación de dichas islas.

En el estudio de Everhard et al., a través de pirosecuenciación de 52 de estas regiones (CpG12→46 y CpG 71→97), llegaron a la conclusión de que la metilación de las 52 islas, así como las metilaciones puntuales de CpG 27, 32, 33, 72→83, 73, 75, 79 y 80, están muy relacionadas con la no expresión del gen MGMT.

Shah et al, por el método de secuenciación bisulfito de 97 de los 98 islotes, encontraron que las islas 25 y 39 estaban muy implicadas en la expresión del gen<sup>10</sup>.

Malley et al. Estudiaron los 98 islotes por pirosecuenciación, y descubrieron dos regiones relacionadas con la actividad del promotor de MGMT, CpG 25→50 y CpG 73→90). Más específicamente, también fueron capaces de demostrar que el islote 89 en particular, era una región notablemente relacionado con la expresión del gen<sup>11</sup>.

Recientemente, basándose en un estudio previo que empleaba únicamente 5 regiones CpG, Quillien et al. Han alcanzado unas conclusiones realmente interesantes en este campo. La primera es que, estudiando 16 islas del gen (CpG 74→89), son las regiones CpG 82→89 las más críticas en la actividad del promotor, siendo especialmente importantes 82, 84, 87 y 89. El otro hallazgo de interés, es que la mejor forma de analizar y evaluar el estado de metilación genética es la pirosecuenciación<sup>12</sup>.

## **Conclusiones**

En vista de los resultados de nuestra investigación, se pueden extraer tres conclusiones. La primera de ellas es que ciertamente hay implicación pronóstica en función de si el gen MGMT está o no silenciado.

La segunda conclusión, es que el análisis del DNA mediante pirosecuenciación es notablemente más útil que el llevado a cabo mediante MSP, ya que permite estudiar cada una de las islas CpG, y no solo ofrecer un resultado dicotómico.



Finalmente, la última de las conclusiones, es que, analizando la curva de supervivencia en función del punto de corte de metilaciones escogido, la supervivencia aumenta conforme mayor es el perfil de metilaciones. Con esto se quiere decir que el perfil molecular cuantitativo, y no solo la clasificación como metilado o no, también tiene una importante implicación en el pronóstico de los pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Reyes Oliveros F, Lema Bouzas M. Gliomas del encéfalo. 1 Ed. Santiago de Compostela: Servizo de Publicacións e Intercambio Científico Campus universitario Sur; 2007.
2. Denicolaï E, Tabouret E<sup>1</sup>, Colin C, Metellus P, Nanni I, Boucard C, Tchoghandjian A, Meyronet D, Baeza-Kallee N, Chinot O, Figarella-Branger D. Molecular heterogeneity of glioblastomas: does location matter?. [Oncotarget](#). 2016 Jan 5;7(1):902-13. doi: 10.18632/oncotarget.6433.
3. Ohgaki H<sup>1</sup>, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007 May;170(5):1445-53.
4. Erwin G. Van Meir, PhD, Costas G. Hadjipanayis, MD, PhD, Andrew D. Norden, MD, MPH, Hui-Kuo Shu, MD, Patrick Y. Wen, MD, and Jeffrey J. Olson, MD. Exciting New Advances in Neuro-Oncology. The Avenue to a Cure for Malignant Glioma. *CA Cancer J Clin*. 2010 May–Jun; 60(3): 166–193.
5. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
6. Chaichana KL<sup>1</sup>, Jusue-Torres I, Lemos AM, Gokaslan A, Cabrera-Aldana EE, Ashary A, Olivi A, Quinones-Hinojosa A. The butterfly effect on glioblastoma: is volumetric extent of resection more effective than biopsy for these tumors? *J Neurooncol*. 2014 Dec;120(3):625-34. doi: 10.1007/s11060-014-1597-9. Epub 2014 Sep 6.



7. Parsa AT<sup>1</sup>, Wachhorst S, Lamborn KR, Prados MD, McDermott MW, Berger MS, Chang SM. Prognostic significance of intracranial dissemination of glioblastoma multiforme in adults. *J Neurosurg.* 2005 Apr;102(4):622-8.
8. Esteller M<sup>1</sup>, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000 Nov 9;343(19):1350-4. Erratum in: *N Engl J Med* 2000 Dec 7;343(23):1740.
9. Kurdyukov S<sup>1</sup>, Bullock M<sup>2</sup>. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel).* 2016 Jan 6;5(1). pii: E3. doi: 10.3390/biology5010003.
10. Shah N, Lin B, Sibenaller Z, Ryken T, Lee H, Yoon JG, Rostad S, Foltz G. Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: correlation with MGMT expression and clinical response in GBM. *PLoS One.* 2013 Jan 7;6(1):e16146. doi: 10.1371/journal.pone.0016146.
11. Malley DS, Hamoudi RA, Kocialkowski 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.* 2013 May;121(5):651-61. doi: 10.1007/s00401-013-0803-5. Epub 2013 Feb 3.
12. Quillien V, Lavenu A, Sanson M, Legrain M, Dubus P, Karayan-Tapon L, Mosser J, Ichimura K, Figarella-Branger D. Outcome-based determination of optimal pyrosequencing assay for MGMT methylation detection in glioblastoma patients. *J Neurooncol.* 2014 Feb;116(3):487-96. doi: 10.1007/s11060-013-1332-y. Epub 2014 Jan 14.
13. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-96.
14. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.
15. Parrish RR, Day JJ, Lubin FD. Direct bisulfite sequencing for examination of DNA methylation with gene and nucleotide resolution from brain tissues. *Curr Protoc Neurosci.* 2012 Jul;Chapter 7:Unit 7.24. doi: 10.1002/0471142301.ns0724s6
16. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clin Chem.* Author manuscript; available in PMC 2010 June 28.