

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía



**DESARROLLO DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL
BIOMARCADOR EPIGENÉTICO *MGMT* EN BIOPSIA LÍQUIDA Y SU
APLICACIÓN EN LA MONITORIZACIÓN DE PACIENTES CON
GLIOBLASTOMA**

Tesis Doctoral
Rocío Rosas Alonso
Madrid, 2021

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**DESARROLLO DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL
BIOMARCADOR EPIGENÉTICO *MGMT* EN BIOPSIA LÍQUIDA Y SU
APLICACIÓN EN LA MONITORIZACIÓN DE PACIENTES CON
GLIOBLASTOMA**

Rocío Rosas Alonso

DIRECTORA
Inmaculada Ibáñez de Cáceres

Madrid, 2021

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Inma por haberme permitido formar parte de su grupo y transmitirme su pasión por la investigación. Gracias por su dedicación y apoyo durante estos años, ha sido una suerte poder aprender de ti.

Cuando tienes a tu alrededor a compañeros como los míos todo resulta mucho más fácil. Gracias Olga por haber sido la mejor profesora de laboratorio que uno pueda tener, por tu paciencia y dedicación interminable. Gracias Julia por dar junto a mí los primeros pasos en el mundo de los exosomas y a Miranda por continuar conmigo este camino con su gran entusiasmo e ilusión. Julián, muchas gracias por tu ayuda estos últimos meses, sabes que te has ganado muchas líneas en este apartado, pero tú decidiste cambiarlas, pronto podré saldar mi deuda. Gracias a Alvarito por ofrecer a las 8 de la tarde ayuda o abrazos, según lo que necesitase en ese momento. Carlos, tengo tanto que agradecerte que no sé ni como empezar así que lo voy a resumir en gracias por existir. Gracias a Itsaso por dejar que te moleste tardes y fines de semana y estar siempre disponible para resolver mis dudas de estadística. Gracias por vuestra ayuda y por alegrar cada uno de mis días.

Gracias a Isabel, por explicarme mil veces la clasificación de los tumores cerebrales y a Virginia, por su dedicación a sus pacientes y recoger las muestras para este trabajo. Gracias a Javier y a su equipo, por transmitirme sus ganas y su motivación para que la ciencia llegue a los pacientes.

Gracias a las vecinas de metabólicas, en especial a Carmencita, por su ayuda y sus consejos.

Gracias a Pedro y a mis resis por sacar adelante el laboratorio de farmacogenética estos meses en los que yo he estado escribiendo esta tesis.

Gracias a mis farmachicas, porque tienen más ganas que yo de que termine esta tesis y pueda volver a nuestras tardes y noches madrileñas.

Gracias a mis padres y a mi hermano por dejarme elegir mi camino y confiar en mí.

Después de 3 años de dedicación y esfuerzo pongo fin a una etapa que me ha permitido crecer tanto a nivel personal como profesional. Cuando mire hacia atrás y recuerde esta tesis recordaré a todas las personas que me acompañaron en esta experiencia y que hicieron de mi lo que soy hoy.

Muchas gracias,

Índice

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS.....	11
INTRODUCCIÓN	15
1. Glioblastoma	15
1.1. Incidencia y epidemiología.....	15
1.2. Diagnóstico clínico y radiológico	15
1.3. Diagnóstico anatomopatológico y molecular	16
1.4. Tratamiento.....	18
1.5. Evaluación de la respuesta	22
1.6. Tratamiento a la progresión.....	23
1.7. Pronóstico	23
2. Epigenética y cáncer.....	24
2.1. Generalidades	24
2.2. Metilación del ADN	25
2.3. Metilación y cáncer	26
2.4. Metilación del promotor del gen <i>MGMT</i> en glioblastoma	27
3. Biopsia líquida	31
3.1. Definición	31
3.2. ADN tumoral circulante.....	32
3.3. Vesículas extracelulares	35
HIPÓTESIS.....	43
OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1. Pacientes	47
2. Líneas celulares	48
3. Procesamiento de las muestras de sangre.....	48
4. Aislamiento de exosomas.....	48
5. Caracterización de exosomas.....	49
6. Aislamiento de ácidos nucleicos	51
7. Modificación del ADN con bisulfito.....	51
8. PCR de preamplificación.....	52
9. PCR específica de metilación (MSP)	53
10. PCR cuantitativa específica de metilación.....	54
11. Análisis de expresión del gen <i>MGMT</i>	56

12. Análisis estadístico	56
RESULTADOS	61
1. Desarrollo y validación de la técnica qMSP.....	61
1.1. Validación analítica	61
1.2. Validación clínica.....	64
2. Estudio de la metilación de <i>MGMT</i> en ADNlc.....	73
3. Estudio de la metilación de <i>MGMT</i> en exoADN.....	75
3.1. Caracterización de los exosomas	75
3.2. Metilación de la región promotora del gen <i>MGMT</i> en exoADN: plasma <i>versus</i> suero	78
3.3. Metilación de la región promotora del gen <i>MGMT</i> en exoADN procedente de plasma de pacientes con glioblastoma.....	79
3.4. Metilación de la región promotora de <i>MGMT</i> en exoADN procedente de plasma de pacientes sanos	82
4. <i>MGMT</i> en exoADN como herramienta de monitorización en pacientes con glioblastoma	83
DISCUSIÓN.....	91
1. Validación de la nueva técnica qMSP para la detección de la metilación de <i>MGMT</i>	91
1.1. Validación analítica	92
1.2. Validación clínica.....	94
1.3. Estandarización	95
2. ADNlc y exoADN como herramientas para la detección de <i>MGMT</i> en biopsia líquida	96
2.1. Plasma <i>versus</i> suero para la detección de la metilación de <i>MGMT</i> en exoADN.....	96
2.2. ADNlc <i>versus</i> exoADN para la detección de la metilación de <i>MGMT</i>	97
3. Uso de exoADN en la monitorización de pacientes con glioblastoma.....	103
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA.....	113
ANEXOS	125

Resumen/Abstract

RESUMEN

El glioblastoma es un tumor devastador del sistema nervioso central que se caracteriza por su mal pronóstico. El esquema actual de tratamiento está basado en radioterapia y quimioterapia con temozolamida. El único biomarcador disponible para predecir la respuesta a este fármaco es la metilación del gen *MGMT*, sin embargo, aún no existen técnicas estandarizadas para su determinación, lo que hace que sea difícil de implementar.

En este trabajo desarrollamos una nueva técnica cuantitativa (qMSP) para la detección de *MGMT* en pacientes con glioblastoma equiparable a la técnica clásica, pero con mayor facilidad de estandarización lo que facilitaría su empleo en tejido, así como en biopsia líquida.

Hasta la fecha, todos los intentos en monitorizar los pacientes con glioblastomas a través de la detección de *MGMT* han fallado, lo que hace que las vesículas extracelulares se conviertan en elementos claves que podrían reinventar el diagnóstico clínico de estos pacientes y abrir nuevas posibilidades de biopsia líquida. Nosotros demostramos en este trabajo que el empleo de ADN procedente de vesículas extracelulares es válido para la detección de la metilación de *MGMT* en biopsia líquida permitiendo monitorizar la respuesta al tratamiento y proporcionando información predictiva relevante para el manejo y la evolución de los pacientes con glioblastomas.

La infradetección molecular no solo da como resultado la pérdida de oportunidades de tratamiento sino también el uso inadecuado de terapias que probablemente no sean efectivas por lo que los resultados obtenidos en este trabajo suponen una importante contribución al campo de la biopsia líquida basada en ADN exosomal, demostrando que refleja la heterogeneidad de todo el tejido tumoral y presentándose como una herramienta prometedora para la detección de biomarcadores.

ABSTRACT

Glioblastoma is a devastating tumor of the central nervous system that is characterized by a poor prognosis. The current treatment regimen is based on radiation therapy and chemotherapy with temozolamide. The only biomarker available to predict response to this drug is *MGMT* methylation; however, there are still no standardized techniques for its determination, which makes its implementation in liquid biopsy difficult.

In this work we develop a new quantitative technique (qMSP) for the detection of *MGMT* in patients with glioblastoma comparable to the classical technique, but with greater ease of standardization which would facilitate its use in both tissue and liquid biopsy.

To date, all efforts to monitor glioblastoma patients through the detection of *MGMT* have failed, making extracellular vesicles a key element that could reinvent the clinical diagnosis of glioblastoma patients and open up new possibilities for liquid biopsy. We showed in this work that the use of extracellular vesicle DNA is valid for the detection of *MGMT* methylation in liquid biopsy allowing the response to treatment to be monitored and providing relevant predictive information for the management and evolution of patients with glioblastoma.

Molecular under-detection not only results in missed treatment opportunities, but also in the inappropriate use of therapies that are likely to be ineffective. Therefore, the results obtained in this work represent an important contribution to the field of exosomal DNA-based liquid biopsy, demonstrating that it reflects the heterogeneity of the entire tumor-tissue and is presented as a promising tool for the detection of biomarkers.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNlc: ADN libre circulante

ADNtc: ADN tumoral circulante

ALA: ácido 5-aminolevulínico

ARNm: ARN mensajero

ATRX: gen remodelador de cromatina ATRX

AUC: area bajo la curva, del inglés, Area Under Curve

BHE: barrera hematoencefálica

CpG: citosina seguida de guanina

CTC: células tumorales circulantes

DMR: región diferencialmente metilada

DNMT: ADN metiltransferasas, del inglés, ADN methyltransferase

ECOG: Estado funcional según el Eastern Cooperative Oncology Group

EDTA: ácido etilen-diamino-tetra-acético

exoADN: ADN procedente de exosomas

FFPE: tejido fijado con formalina e incluido en parafina

GB: glioblastoma

GBr: GB recurrente

IC: Intervalo de confianza del 95%

IDH1: isocitrato deshidrogenasas 1

IDH2: isocitrato deshidrogenasas 2

ISEV: La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares

LCR: líquido cefalorraquídeo

M: ADN metilado

MET: Microscopía Electrónica de Transmisión

MGMT: O6-metilguanina-ADN metiltransferasa

MSP: PCR específica de metilación

NM: ADN no metilado

NTA: análisis de rastreo de nanopartículas, del inglés Nanoparticle Tracking Analysis

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBMC: de células mononucleares de sangre periférica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PET: tomografía por emisión de positrones

PFA: paraformaldehído

RANO: criterios de evaluación de la respuesta en neuro-oncología, del inglés, Response Assessment in Neuro-Oncology

RM: resonancia magnética

ROC: Característica Operativa del Receptor, del inglés, Receiver Operating Characteristic

SAM: S-adenosilmetionina

SFB: suero fetal bovino

SG: supervivencia global

SLP: supervivencia libre de progresión

SNC: sistema nervioso central

TMZ: temozolamida

TP53: la proteína tumoral p53

VE: vesículas extracelulares

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Glioblastoma

1.1. Incidencia y epidemiología

El glioblastoma (GB) es el tumor glial de alto grado más frecuente del sistema nervioso central (SNC), representando aproximadamente el 60% de los tumores cerebrales primarios (1, 2). Presenta una incidencia anual de 3-5/100.000 habitantes (3), mucho más baja que otros tipos tumorales como el cáncer de pulmón o de mama. Debido a esta baja incidencia, el GB puede considerarse una enfermedad rara. La mediana de edad de los pacientes en el momento del diagnóstico del GB es de 64 años, pero puede afectar tanto a niños como a adultos con un ligero predominio en varones (1, 2).

1.2. Diagnóstico clínico y radiológico

El diagnóstico del GB se basa en la combinación de varias pruebas que nos permitirán determinar el grado de agresividad y la extensión del tumor. El diagnóstico debe incluir en primer lugar una exploración física y neurológica para evaluar los signos y síntomas del paciente que permitirán sospechar de una afectación del SNC. Son signos característicos la epilepsia de nueva aparición, el deterioro neurocognitivo e indicadores del efecto de masa intracraneal, como dolor de cabeza, vómitos o alteración de la conciencia (3-5). La prueba radiológica de primera elección para el diagnóstico de GB es la resonancia magnética (RM) con contraste de gadolinio, que adquiere imágenes precisas de los tumores del SNC (4, 5). La RM es una técnica de imagen no invasiva que genera imágenes de las estructuras del SNC mediante el uso de radiación electromagnética no ionizante. Se basa en el fenómeno físico por el cual ciertos núcleos atómicos pueden absorber energía de radiofrecuencia al ser sometidos a un campo magnético. Al cesar la radiofrecuencia, los núcleos pueden reemitir la energía a una frecuencia característica, permitiendo crear imágenes distintas según la composición corporal (6, 7). La liberación de energía por parte de los núcleos se puede realizar como relajación longitudinal (T1), relajación transversal (T2) o relajación atenuada de fluido (FLAIR), permitiendo crear distintas imágenes (**Figura 1**) (7-9).

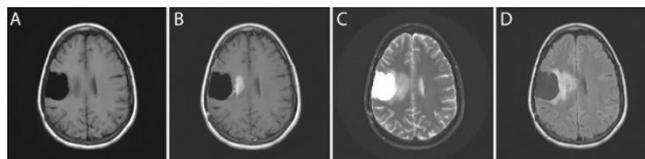


Figura 1. RMN de un paciente con GB. **A:** GB en secuencia T1. **B:** GB en secuencia T1 con contraste. **C:** GB en secuencia T2. **D:** GB en secuencia FLAIR (9).

El campo de la RM está en creciente evolución añadiéndose nuevos avances a las técnicas clásicas como la difusión, la perfusión cerebral y la espectroscopia. Por todo ello, la RM presenta una sensibilidad y especificidad para determinar un glioma de alto grado de 72,5% y 65,0%, respectivamente (8, 10, 11).

Otra prueba radiológica complementaria que puede ser de utilidad sería la tomografía por emisión de positrones (PET) que ayuda a definir los puntos con mayor actividad metabólica tras la administración de un radiofármaco (metionina o fluoroetiltirosina) detectando así las células tumorales (3).

1.3. Diagnóstico anatomopatológico y molecular

El sistema nervioso está constituido fundamentalmente por dos tipos de células, las neuronas y las células gliales. La función más conocida de las células gliales es la formación de vainas de mielina alrededor de los axones. La glía también mantiene las concentraciones adecuadas de iones y neurotransmisores en el entorno neuronal (12). Los gliomas incluyen una variedad de tumores malignos primarios del SNC que se desarrollan a partir de células gliales, como astrocitos, oligodendrocitos o microglía (**Figura 2**) (13).

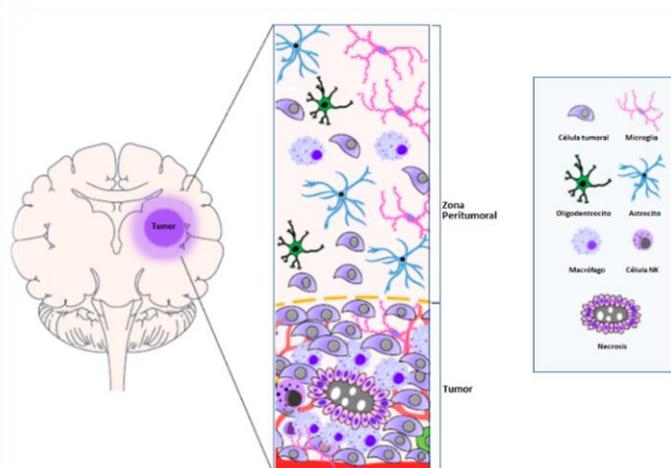


Figura 2. Representación de las principales poblaciones celulares presentes en el GB y en el tejido peritumoral. Modificado de (13).

La clasificación moderna de los gliomas se basa en la Clasificación de tumores del SNC de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicada por primera vez en 1979 y revisada cuatro veces desde entonces, siendo la más reciente de 2016 (14, 15). En la edición de 2016, la OMS clasifica los gliomas infiltrantes en un diagnóstico que integra el tipo histológico, el grado y la información molecular. Los marcadores moleculares necesarios para el diagnóstico de los gliomas infiltrantes incluyen las mutaciones en los genes de las enzimas isocitrato deshidrogenasas 1 y 2 (*IDH1* e *IDH2*), la codeleción de 1p/19q y la mutación K27M de la histona

3 (**Tabla 1**). Además, describe también otras alteraciones moleculares, como alteraciones en el gen remodelador de cromatina ATRX (*ATRX*) y en la proteína tumoral p53 (*TP53*), que no son necesarias para el diagnóstico pero son características de los astrocitomas difusos IDH mutados (14).

Astrocitoma difuso y tumores oligodendrogiales
Astrocitoma difuso. IDH mutado
Astrocitoma gemistocítico. IDH mutado
Astrocitoma difuso. IDH no mutado
Astrocitoma difuso. NOS
Astrocitoma anaplásico. IDH mutado
Astrocitoma anaplásico. IDH no mutado
Astrocitoma anaplásico. NOS
Glioblastoma. IDH no mutado
Glioblastoma de células gigantes
Gliosarcoma
Glioblastoma epitelioide
Glioblastoma. IDH mutado
Glioblastoma. NOS
Glioma difuso de la línea media, con mutación H3 K27M
Oligodendroglioma. IDH mutado y codelección 1p/19q
Oligodendroglioma. NOS
Oligodendroglioma anaplásico. IDH mutado y codelección 1p/19q
Oligodendroglioma anaplásico. NOS
Oligoastrocitoma. NOS
Oligoastrocitoma anaplásico. NOS

Tabla 1. Clasificación de los gliomas infiltrantes según la OMS. NOS: IDH no identificado. Modificado de (14).

Por lo tanto, en base a los datos que se han proporcionado anteriormente, el GB se define como un astrocitoma grado IV por su alta capacidad para infiltrar el tejido cerebral circundante. Dentro de los GB se distinguen el GB IDH no mutado, que se corresponde con mayor frecuencia con el GB primario y predomina en los pacientes mayores de 55 años; el GB IDH mutado, alrededor del 10% de los casos y que se relaciona estrechamente con el GB secundario con antecedentes de glioma de bajo grado y que surge preferentemente en pacientes jóvenes; y el GB IDH no identificado (NOS), clasificación reservada para aquellos casos cuando no ha sido posible realizar el análisis de IDH (14).

Sin embargo, recientemente ha habido importantes avances que incorporan enfoques moleculares adicionales que se han incluido en los #
del inglés; *Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to SNC Tumor Taxonomy o cIMPACT-NOW*) (16-22). Este consorcio tiene como objetivo ayudar a la incorporación de la información molecular a la práctica diaria, así como recomendar los cambios a incluir en las próximas versiones de la

clasificación de la OMS. Presenta aclaraciones a conceptos descritos en la versión de la OMS de 2016, además de nuevos biomarcadores que dan lugar a nuevas entidades, proponiendo una nueva clasificación.

Así, siguiendo las indicaciones propuestas por el cIMPACT-NOW, dentro de los GB IDH no mutados se encuentran los descritos histológicamente con las características clásicas de grado IV de marcada hiper celularidad, atipia nuclear con proliferación microvascular y/o necrosis, pero también aquellos que no cumpliendo las características histológicas clásicas (gliomas infiltrantes morfológicamente grados II o III) presentan amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), mutación del promotor de la telomerasa transcriptasa inversa (*TERT*) o ganancia de cromosoma 7 y pérdida del 11 y que darían lugar un curso clínico más agresivo similar a un GB IDH no mutado clásico, según los criterios descritos en el documento c-IMPACT-NOW 3 y c-IMPACT-NOW 6 (18, 21, 23, 24).

Por su parte, en los GB IDH mutados se encuentran los descritos histológicamente con las características morfológicas de grado IV (proliferación microvascular y/o necrosis) pero también aquellos que según los criterios descritos en el documento c-IMPACT-NOW 5 no presentan las características histológicas clásicas pero sí tienen características moleculares que confieren un peor pronóstico, como la delección en homocigosis del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A o 2B (*CDKN2A* y *CDKN2B*) (20, 24, 25). Los autores también hacen la recomendación de cambiar el grado a números arábigos (es decir, grado 4) y cambiar el término glioblastoma por el de astrocitoma. Esto último debido al mejor pronóstico que tienen con respecto a los GB IDH no mutados.

1.4. Tratamiento

El tratamiento del GB se basa en tres aspectos principales: la resección quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia. Por ello, es necesario un enfoque multidisciplinar que incluya especialistas en neurocirugía, radiología, anatomía patológica, genética molecular, oncología radioterápica y oncología médica (3).

Resección quirúrgica

El tratamiento inicial consiste en lograr la máxima resección quirúrgica posible preservando la función cerebral. El tratamiento quirúrgico, si bien no es curativo, tiene un papel clave ya que proporciona tejido para el diagnóstico anatomopatológico y molecular, así como disminuir la presión que ejerce el tumor sobre otras estructuras del SNC. Las nuevas técnicas intraoperatorias que emplean el marcador fluorescente ácido 5-aminolevulínico (ALA) bajo luz

azul, permiten mejorar la extensión de la resección ya que mejora la visualización del tumor (Figura 3) (26-28).

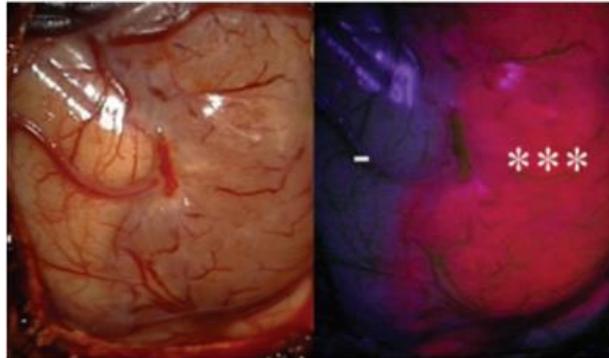


Figura 3. Fotografías obtenidas en un paciente con glioma después de la administración de ALA. Se muestra la cavidad de resección en condiciones de luz normales (izquierda) e iluminada con luz azul (derecha). ***Tejido tumoral que muestra fluorescencia rosada por ALA. - Tejido no tumoral que no muestra fluorescencia por ALA (28).

Múltiples estudios muestran la importancia de la citorreducción, relacionándose con los hallazgos de la RM postoperatoria y con una mayor supervivencia de los pacientes con mayor extensión de resección (28-33). Sin embargo, el tratamiento quirúrgico es complejo debido a la naturaleza infiltrante del GB, siendo en ocasiones difícil definir los límites del tumor durante la cirugía. Los estudios han demostrado que la resección macroscópicamente completa de tumores se logra en menos del 20-30% de pacientes (34-36). En el caso de tumores inaccesibles quirúrgicamente, la biopsia proporciona la muestra para establecer el diagnóstico.

Quimio-radioterapia

Después de la máxima resección quirúrgica que sea posible realizar, el estándar de tratamiento de los GB es el esquema STUPP que incluye el uso concomitante de temozolamida (TMZ) y radioterapia seguida de TMZ en monoterapia durante 6 ciclos. La TMZ se administra diariamente durante la radioterapia (7 días a la semana) y durante cinco días cada cuatro semanas durante seis ciclos como tratamiento de mantenimiento después de la radioterapia. Este tratamiento fue aprobado tras un ensayo clínico fase III que demostró el beneficio de la concomitancia con una mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) de 6,9 meses (Intervalo de confianza del 95% o IC: 5,8-8,2) frente a la radioterapia sola con mediana de supervivencia de 5 meses (IC: 4,2 5,5) (Figura 4). La supervivencia a dos años mejoró del 10% al 26% y del 0% al 10% a los 5 años (37, 38).

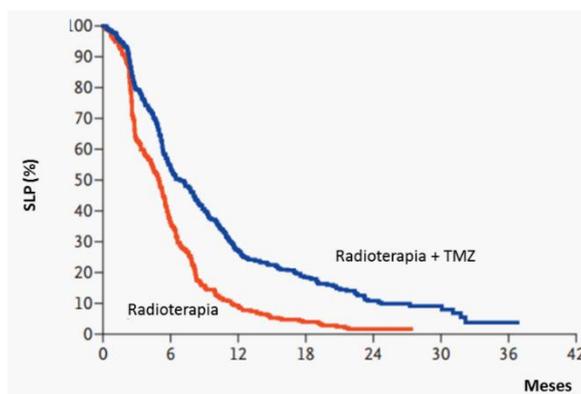


Figura 4. Kaplan-Meier de SLP según grupo de tratamiento. La razón de riesgo (hazard ratio o HR) de progresión de la enfermedad entre los pacientes tratados con radioterapia más temozolomida en comparación con los tratados con la radioterapia sola fue de 0,54 (IC: 0,45 - 0,64). Modificado (37).

La TMZ se sintetizó en la década de 1980 como un fármaco que mostraba excelentes propiedades antineoplásicas *in vivo* e *in vitro* (39, 40). Su mecanismo de acción se basa en la acción alquilante de su metabolito activo (monometil-triazenoimidazol-carboxamida o MTIC), produciendo una modificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante la adición de grupos metilo en el nitrógeno 7 (N⁷) y oxígeno (O⁶) de la guanina. Esto provoca un apareamiento incorrecto de bases que cuando no puede ser reparado causa la rotura del ADN e induce la muerte celular por apoptosis (41, 42).

Sin embargo, la eficacia de la TMZ puede verse influida por los niveles de expresión génica dentro de las células tumorales de los genes reparadores del ADN. Entre estos mecanismos destaca la eliminación de grupos alquilo producida por la enzima O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT). El daño en el ADN producido por la TMZ podría ser reparado por la enzima desmetilante MGMT eliminando los grupos alquilo del ADN producidos por el fármaco y dando lugar a la supervivencia de la célula tumoral (**Figura 5**) (41).

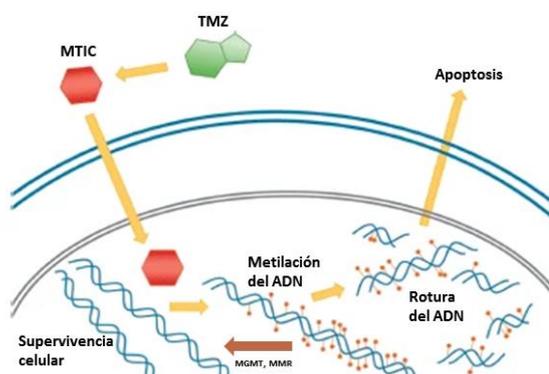


Figura 5. Mecanismo de acción de la TMZ. MGMT: O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa. MMR: mecanismo de reparación por apareamiento erróneo. MTIC: monometil-triazenoimidazol-carboxamida. Modificado de (41).

Esteller *et al.* describieron que la actividad de *MGMT* está regulada epigenéticamente. La metilación del promotor de *MGMT* provoca el silenciamiento del gen dando lugar a que los aductos de ADN producidos por la terapia alquilante no puedan ser eliminados de manera eficiente, lo que conduce a la muerte de las células tumorales y a la toxicidad del fármaco. Por el contrario, los gliomas con un promotor *MGMT* no metilado expresan la proteína *MGMT* que elimina los aductos del ADN producidos por la administración de TMZ produciendo una resistencia al fármaco (**Figura 6**) (43, 44).

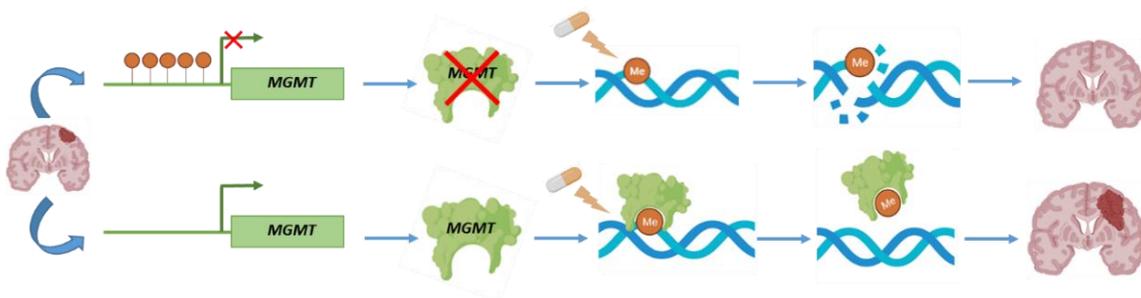


Figura 6. Mecanismo de quimiosensibilidad y resistencia según el estado de metilación del promotor del gen *MGMT*.

Hegi *et al.* comprobaron la relación entre el silenciamiento del gen *MGMT* en el tumor y la supervivencia de los pacientes tratados con radioterapia y TMZ y obteniendo que la mediana de supervivencia global (SG) de los pacientes con el promotor metilado fue de 18,2 meses (IC: 15,5 - 22,0), en comparación con 12,2 meses entre los que no tenían metilación (IC: 11,4 - 13,5) (**Figura 7**) (45).

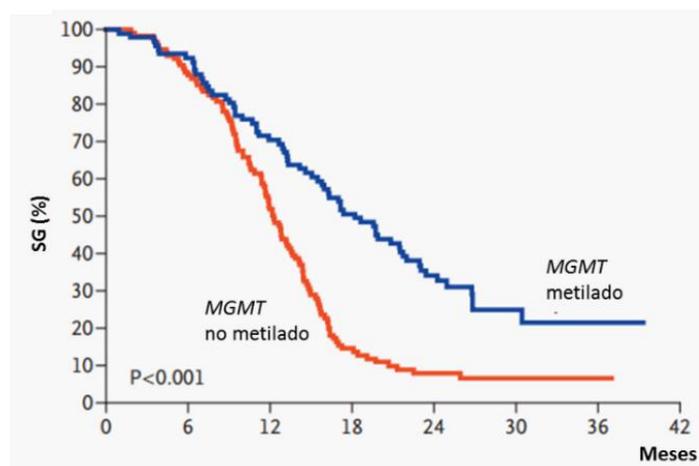


Figura 7. Kaplan-Meier de SG según el estado de metilación del promotor *MGMT*. HR = 0,45 (IC 0,32 - 0,61). Modificado de (45).

En pacientes mayores de 70 años con el promotor de *MGMT* no metilado, la radioterapia sola demostró superioridad en un ensayo aleatorizado de fase III (46). Mientras que en aquellos pacientes mayores con *MGMT* metilado la TMZ en monoterapia ha mostrado mejor resultado en comparación con la radioterapia sola en dos ensayos aleatorizados (3, 47, 48).

Por lo tanto, los pacientes cuyos tumores presentan el promotor del gen *MGMT* no metilado obtienen menor beneficio del tratamiento. Para estos pacientes, deben desarrollarse tratamientos alternativos con un mecanismo de acción diferente o métodos que incluyan el silenciamiento de *MGMT* (45).

1.5. Evaluación de la respuesta

La RM con espectroscopia, RM de difusión y RM de perfusión constituyen el método de imagen de elección para la evaluación de la respuesta de los tumores del SNC. En el caso de los GB, esta evaluación es más compleja que en otros tipos tumorales debido a las características anatómicas del SNC y al carácter infiltrante de estos tumores (49).

En 1990, Macdonald *et al.* definieron unos criterios radiológicos para la evaluación de respuesta en los tumores del SNC basados en la medición en dos dimensiones del área que capta contraste en la prueba de imagen (50). Sin embargo, este método presentaba varias limitaciones y fue reemplazado en 2010 por los criterios RANO (del inglés, *Response Assessment in Neuro-Oncology*) (51). Los criterios RANO tienen en cuenta los avances en RM y los efectos sobre la barrera hematoencefálica (BHE) que pueden presentar algunos de fármacos (**Tabla 2**), aspectos no tenidos en cuenta por los criterios Macdonald (49, 51).

Criterio	RC	RP	EE	PE
Lesiones captantes en T1	No hay			
Lesiones en T2/FLAIR	-	-	-	
Lesiones nuevas	No hay	No hay	No hay	Presentes
Corticoides	No	-	-	No aplicable
Situación clínica	-	-	-	
Condiciones para la respuesta	Todas	Todas	Todas	Alguna

Tabla 2. Resumen de los criterios RANO. RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EE: enfermedad estable; PE: progresión (49). : aumenta o mejora; : disminuye o empeora.

En algunos pacientes, la primera RM tras el tratamiento concomitante de quimio-radioterapia puede mostrar aumento en la captación del contraste sin que exista progresión tumoral (pseudoprogresión), debido a cambios provocados por la radiación que produce una respuesta inflamatoria con incremento de la permeabilidad vascular (51, 52). En estos casos, la quimioterapia debe continuarse y las imágenes se repetirán después de 6-8 semanas. En casos de diagnóstico diferencial dudoso entre la recidiva tumoral y los cambios inespecíficos inducidos por el tratamiento, la espectroscopia de RM y el PET pueden ser útiles en algunos casos (53).

1.6. Tratamiento a la progresión

El tratamiento del GB recurrente (GBr) es uno de los mayores retos de oncología, ya que a pesar de los nuevos tratamientos que se han desarrollado en los últimos años aún no existe un tratamiento de segunda línea efectivo. Además, los pacientes con GBr generalmente se enfrentan a un rápido deterioro del estado funcional y la calidad de vida, que hace que a menudo la única opción sean los cuidados paliativos (54).

Sólo entre el 20-30% de los pacientes con GBr son candidatos a una segunda cirugía (54-56). El bevacizumab y la quimioterapia siguen siendo las alternativas terapéuticas más utilizadas en la mayoría de los pacientes, aunque el beneficio clínico que ofrecen es muy limitado (57, 58). La re-irradiación con re-exposición a TMZ puede ser una opción razonable, pero sólo en aquellos pacientes previamente respondedores y con un intervalo sin tratamiento de al menos 5 meses desde el último ciclo de TMZ (54, 59, 60).

Por lo tanto, para estos pacientes se proponen en ensayos clínicos nuevos tratamientos alternativos con fármacos que presenten mecanismo de acción diferente. Sin embargo, los resultados preliminares de los estudios con inhibidores de puntos de control inmune no han demostrado buenos resultados por lo que el tratamiento con virus oncolíticos surge como una terapia más prometedora en el GBr, especialmente en combinación con otras estrategias (54).

1.7. Pronóstico

El GB es el tumor cerebral más agresivo, lleva asociado unas probabilidades muy altas de recidiva y presenta un pronóstico fatal. A pesar del tratamiento quirúrgico y la quimiorradioterapia, la mediana de SG es de 14,6 meses (IC: 13,2 - 16,8) y la supervivencia a 5 años es inferior al 10%. Este pronóstico desfavorable se debe a la aparición de resistencia a la terapia que provoca una recaída temprana del tumor a pesar de los tratamientos, presentando una mediana SLP de 6,9 (IC: 5,8 - 8,2) meses (37).

La determinación del estado de metilación del promotor del gen *MGMT* puede permitir la selección de los pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse del tratamiento con TMZ, presentando en este caso una mediana de SG de 18,2 meses (IC: 15,5 - 22,0). El pronóstico para los pacientes con tumores con el gen *MGMT* no metilado es más desfavorable, obteniendo muy poco beneficio del tratamiento, con una mediana de SG de 12,2 meses (IC 11,4 - 13,5) (45).

2. Epigenética y cáncer

2.1. Generalidades

El ser humano está compuesto de cientos de tipos de células especializadas que parten de un mismo genoma pero que expresan diferentes genes que hacen que cada célula sea diferente (**Figura 8**). El estudio de los mecanismos que regulan la expresión de los genes sin que exista una modificación en la secuencia del ADN se denominó epigenética. El término fue introducido por Conrad Hal Waddington en 1942 para describir cómo las interacciones entre los genes y el ambiente pueden producir cambios en el fenotipo (61).

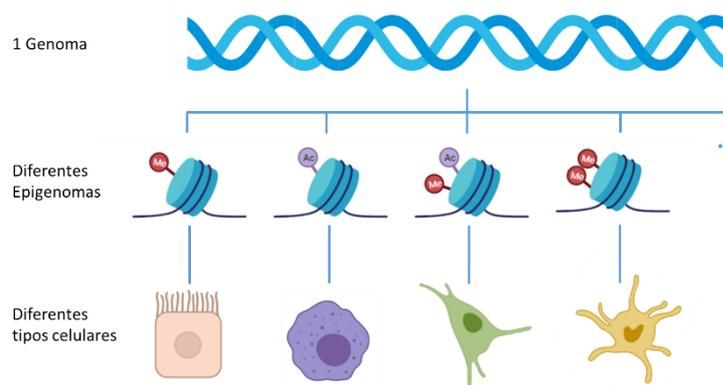


Figura 8: Una única secuencia de ADN puede dar lugar a múltiples firmas epigenéticas que dan lugar a diferentes tipos celulares.

El término epigenética ha ido evolucionando a lo largo de la historia existiendo múltiples definiciones formuladas por diferentes autores (62-64), la última de ellas ha sido propuesta por Giacomo Cavalli en 2019, definiendo la epigenética como el estudio de moléculas y mecanismos que pueden perpetuar estados alternativos de actividad genética en el contexto de la misma secuencia de ADN (65).

A nivel molecular, la epigenética se basa en modificaciones covalentes de las bases de citosina e histonas, miARNs y cambios en la posición de los nucleosomas. Estos mecanismos están involucrados en la expresión de los genes, movilidad de elementos transponibles, diferenciación celular, embriogénesis, inactivación de cromosoma X e impronta genómica (66).

Así, gemelos monocigóticos que son idénticos en la secuencia de ADN pueden tener diferentes perfiles de metilación y de modificación de histonas que podrían afectar la susceptibilidad de sufrir diferentes enfermedades (66-68). Por lo tanto, la regulación epigenética es imprescindible para explicar por qué un mismo genotipo puede generar la amplia gama de fenotipos diferentes.

2.2. Metilación del ADN

La metilación del ADN es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados, ya que es un factor crítico en la regulación transcripcional (66).

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo a una citosina que va seguida de guanina (CpG). Las posiciones CpG no son aleatorias en el genoma sino que tienden a agruparse en regiones llamadas islas CpG. Las islas CpG, definidas como regiones de más de 200 bases con un contenido de GC de al menos 50% y donde la proporción de CpG esperado y observado es mayor de 0,6 (69). Las islas CpG se ubican principalmente en el promotor y/o el primer exón de diversos genes así como en los elementos repetitivos. Aproximadamente el 60% de los promotores de genes humanos están asociados con islas CpG y generalmente no están metilados en células normales, aunque algunos de ellos (~6%) se metilan de una manera específica de tejido durante las primeras etapas del desarrollo (66).

La metilación del ADN está mediada por una familia de enzimas, las ADN-metiltransferasas o DNMT (del inglés, *ADN methyltransferase*) que catalizan la transferencia de grupos metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) al ADN.

En mamíferos, se han reportado cinco miembros de DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L, pero solo DNMT1, DNMT3a y DNMT3b poseen actividad metiltransferasa. Las DNMT3a y DNMT3b se clasifican habitualmente en DNMT de *novo* ya que son responsables de establecer el patrón de metilación durante el desarrollo embrionario. La DNMT1 es una DNMT de mantenimiento. La DNMT3L, es necesaria para establecer la impronta genómica materna y actúa como un factor estimulante general para DNMT3a y DNMT3b. Por su parte, la DNMT2 metila ARN de transferencia (66, 70). La DNMT3b se ha relacionado con la hipermetilación de genes supresores tumorales (71).

Cómo la metilación del ADN contribuye a la inhibición de la expresión génica, todavía sigue sin estar claro y se han propuesto varias hipótesis. Primero, para algunos factores de transcripción como AP-2, c-myc, CREB / ATF, E2F y NF- κ B, se cree que la metilación del ADN crea una barrera física, aboliendo el acceso a los sitios de unión del promotor (72). Otro modelo de inactivación genética mediada por metilación del ADN es el relacionado con las proteínas del dominio de unión de metil-CpG (MBD). Estas proteínas reconocen el ADN cuando está metilado y forman complejos multiproteicos que incluyen histonas acetiladas, causando condensación de cromatina y bloqueando por tanto la unión de la ARN polimerasa y la maquinaria transcripcional al ADN (73).

2.3. Metilación y cáncer

El cáncer se ha definido como un grupo de enfermedades que resultan de la acumulación creciente de alteraciones moleculares. Además de presentar las alteraciones genéticas clásicas (mutaciones, traslocaciones, amplificación) las células tumorales presentan un paisaje epigenético profundamente alterado, mostrando cambios globales en los perfiles de metilación del ADN, en los patrones de modificación de histonas y en los perfiles de expresión de enzimas modificadoras de cromatina, desempeñando un papel importante en la iniciación y progresión tumoral (72).

En 1983 Feinberg y Vogelstein observaron una reducción de la metilación del ADN de genes en células de cáncer de colon humano en comparación con tejidos normales (74). En el mismo año, Gama-Sosa *et al.* describieron una reducción global del contenido de 5-metilcitosina del ADN de muestras tumorales (75). Curiosamente, en el cáncer pueden observarse tanto eventos de hipometilación global como de hipermetilación de regiones específicas. En general, las células cancerosas se caracterizan por una pérdida global de metilación del ADN (20 a 60% menos de 5-metil-citosina). La hipometilación global ocurre principalmente en secuencias repetitivas, reactivando elementos transponibles que pueden integrarse en sitios aleatorios del genoma, lo que conduce a mutagénesis e inestabilidad genómica (**Figura 9**) (72).

En contraste con la hipometilación global del ADN, ciertos genes supresores tumorales son inactivados como consecuencia de la hipermetilación de islas CpG en regiones reguladoras. El silenciamiento asociado a la metilación en estos genes juega un papel crucial en la tumorigénesis ya que las células son más susceptibles a mutaciones debido a una reparación defectuosa del ADN favoreciendo el proceso carcinogénico y promoviendo que las células se dividan descontroladamente, un sello distintivo de todos los tipos de cáncer humano (**Figura 9**) (72, 76, 77).

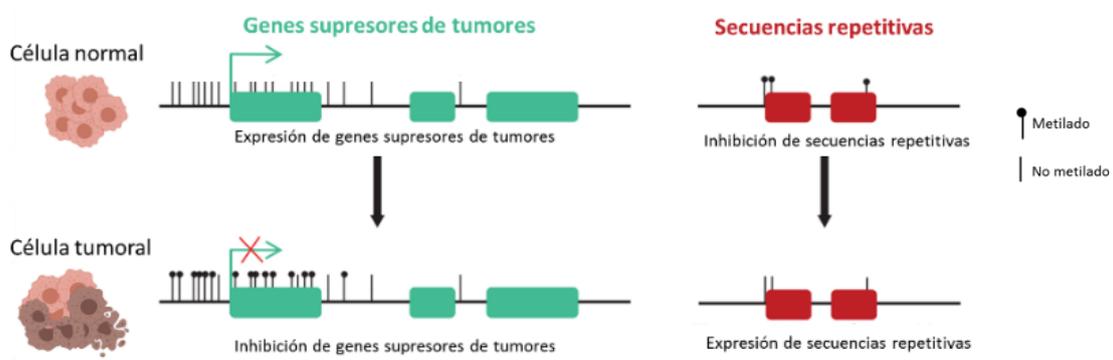


Figura 9. Silenciamiento asociado a metilación en genes supresores de tumores y secuencias repetitivas en célula normal y célula tumoral. Modificado de (77).

Este tipo de silenciamiento epigenético se demostró por primera vez en los estudios de pacientes con retinoblastoma en los que se descubrió la hipermetilación en el promotor del gen supresor de tumores del retinoblastoma o *RB1* (78). Desde entonces, se han identificado un gran número de genes supresores de tumores silenciados por hipermetilación del ADN en diferentes tumores (**Tabla 3**) (72, 79).

	Cáncer de mama	Cáncer de pulmón	Cáncer de próstata	Cáncer de colon	Leucemia/Linfoma
<i>APC</i>	x	x	x	x	
<i>BMAL1</i>					x
<i>BRCA1</i>	x				
<i>CDH1</i>	x	x	x	x	x
<i>CDH13</i>	x	x		x	x
<i>CDKN2A</i>	x	x	x	x	x
<i>CDKN2B</i>					x
<i>P14</i>				x	
<i>COX2</i>				x	
<i>CRBP1</i>				x	x
<i>DAPK1</i>		x		x	x
<i>ESR1</i>	x	x	x		x
<i>GATA4</i>				x	
<i>GATA5</i>				x	
<i>GSTP1</i>		x	x		
<i>HIC1</i>	x	x		x	x
<i>IGFBP3</i>		x			
<i>MGMT</i>		x		x	x
<i>MLH1</i>				x	
<i>NORE1A</i>		x			
<i>PYCARD</i>	x	x			
<i>RARB2</i>		x		x	x
<i>RASSF1A</i>	x	x	x	x	x
<i>TLE1</i>					x
<i>TP73</i>					x

Tabla 3. Ejemplos de genes silenciados por hipermetilación del promotor en los tipos tumorales más frecuentes. Modificado de (72).

Los ejemplos antes mencionados confirman que la metilación aberrante de las islas CpG contribuye al desarrollo y la progresión del cáncer, al afectar a los genes implicados en procesos celulares cruciales y proponiéndose, por tanto, la detección de genes metilados como una nueva generación de biomarcadores en cáncer (80).

2.4. Metilación del promotor del gen *MGMT* en glioblastoma

La metilación del promotor del gen *MGMT* es uno de los biomarcadores moleculares más estudiados en neuro-oncología. El gen *MGMT* codifica una enzima nuclear reparadora que elimina los grupos alquilo de la posición O⁶ de la guanina y actúa antagonizando los efectos citotóxicos de los agentes alquilantes (44). Se ha detectado presencia de ARN mensajero de

MGMT en todos los tejidos (**Figura 10**) y su silenciamiento por metilación sólo ha sido reportado asociado a cáncer.

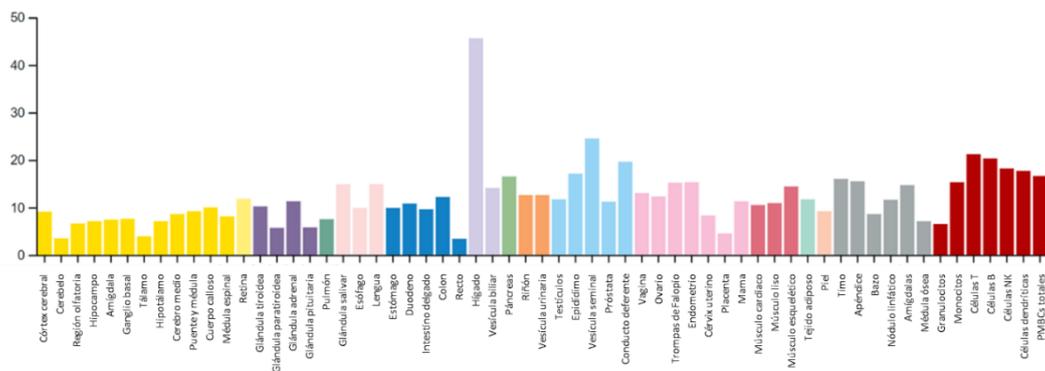


Figura 10. Niveles de ARN de *MGMT* en diferentes tejidos.

Como se ha comentado en el apartado de tratamiento, la TMZ daña el ADN metilando el oxígeno en la posición 6 de los nucleótidos de guanina transformándola a O⁶-alquilguanina. Los aductos de O⁶-metilguanina resultantes generan errores de apareamiento con timinas. Las enzimas reparadoras de errores de apareamiento del ADN intentan escindir la O⁶-metilguanina, generando en el proceso roturas de una o dos hebras y, por tanto, la apoptosis celular (44). Sin embargo, la enzima reparadora *MGMT* restaura la guanina normal transfiriendo el grupo metilo a un residuo de cisteína de la enzima. Una molécula de *MGMT* puede reparar solo un aducto de alquilo. La proteína *MGMT* alquilada se dirige entonces a la degradación por ubiquitinación (reacción suicida). Por tanto, la capacidad de reparar O⁶-metilguanina depende de la cantidad y la tasa de producción de *MGMT* (**Figura 11**)(44, 81).

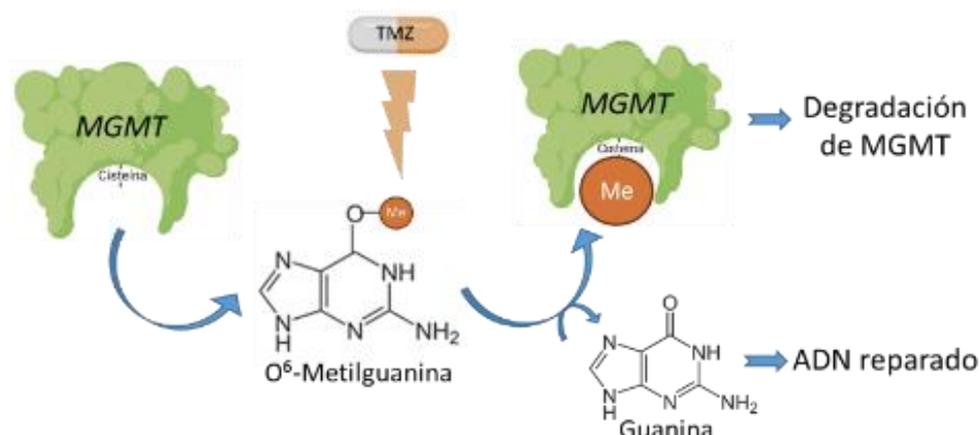


Figura 11. *MGMT* transfiere el grupo metilo de la posición O⁶ de la guanina a una cisteína dentro de su propia secuencia en una reacción que inactiva una molécula de *MGMT* por cada lesión reparada.

Como resultado, cada molécula de MGMT rescata a la célula del daño inducido por TMZ y, por lo tanto, conduce a la resistencia a la terapia. Los gliomas con inactivación del gen *MGMT* son incapaces de reparar el ADN lo que conduce a una mayor sensibilidad a la quimioterapia basada en agentes alquilantes como se ha comentado previamente.

Aunque se están utilizando diferentes métodos para la detección de la metilación del promotor de *MGMT*, todavía no hay consenso en cuanto a qué método se correlaciona mejor con la respuesta clínica del paciente. La relación entre los diferentes sitios de metilación del promotor y su efecto sobre el silenciamiento génico aún está en investigación por lo que la mayoría de los métodos en la práctica clínica evalúan un número pequeño de posiciones CpG concretas y no toda la región promotora de *MGMT* (81).

La isla CpG del gen *MGMT* se ubica en el cromosoma 10q26.3, abarca 762 pb (chr10: 131264949-131265710) y contiene 98 dinucleótidos CpG que controlan su expresión. Para investigar el impacto de los CpG individuales en el control transcripcional, con el objetivo de definir la región adecuada para las pruebas clínicas de metilación, Malley *et al.* estudiaron el estado de metilación de toda la isla CpG utilizando pirosecuenciación y lo compararon con los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) en una serie de líneas celulares de glioblastoma y xenoinjertos (82). Asignaron números consecutivos a los CpG de 5' a 3' en la cadena codificante del gen *MGMT* comenzando desde CpG1 y hasta la CpG98. En este trabajo identificaron dos regiones separadas en las que el estado de metilación se correlacionó significativamente con la expresión: la región diferencialmente metilada o DMR1 ubicada entre las CpG25 y CpG50 y la región diferencialmente metilada 2 (DMR2) que abarca de la CpG73 a la CpG90 (82). La mayoría de los ensayos se basan en el análisis de los sitios CpG 73 a 90 ubicados en el área DMR2. En toda esta área, los CpG 83, 86, 87 y 89 han sido los mejores objetivos para las pruebas de metilación (82). En concordancia con estos resultados, en el estudio de Everhard *et al.* se describieron seis sitios CpG que correlacionaban estado de metilación y expresión génica, cuatro de los cuales se encontraban en el área DMR2 (CpG 73, 75, 79 y 80) (83). Además, Bady *et al.* describieron dos sitios CpG en el promotor de *MGMT* (cg12434587, chr10: 131265209-131265210 y cg12981137, chr10: 131265575-131265576) cuya metilación se asociaba estrechamente con la supervivencia, siendo la cg12981137 la CpG 84 del área DMR2 (84), y apoyando la idea propuesta por Malley *et al.* (**Figura 12**) (82).

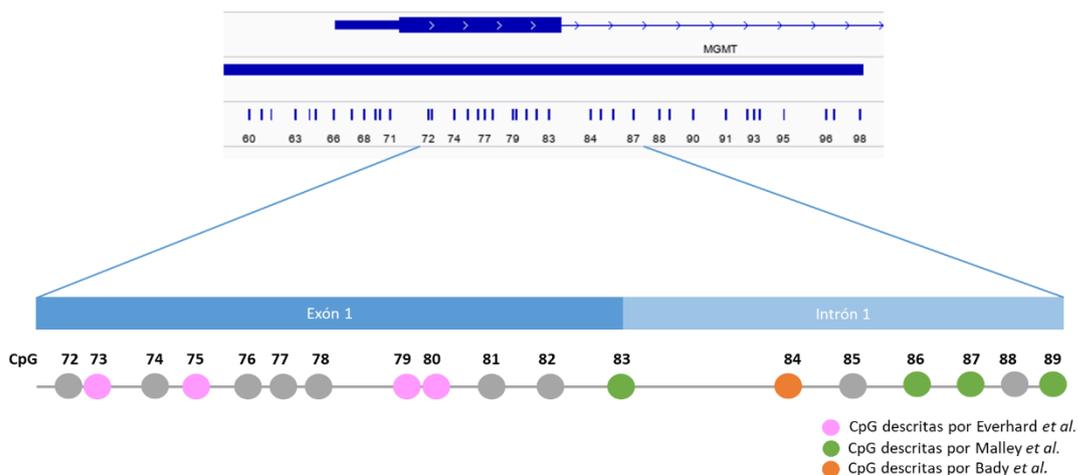


Figura 12. Posiciones CpG que relación metilación y expresión en diferentes artículos.

Existen disponibles una amplia gama de ensayos para la detección de la metilación de *MGMT*. Los métodos más utilizados se basan en la conversión de bisulfito de citosinas no metiladas en uracilo (85). Ejemplos de estos métodos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de metilación (MSP) (44, 86, 87), la pirosecuenciación (86-88), diferentes variaciones de PCR en tiempo real (87, 89), PCR digital (90) o ligación de amplificación específica de sonda (MS-MLPA) (86, 91). Otras técnicas que pueden evaluar los cambios globales de metilación como la secuenciación masiva se reservan para el campo de la investigación (92).

Actualmente, la MSP y la pirosecuenciación son los enfoques más utilizados ya que proporcionan información útil para la toma de decisiones clínicas. Sin embargo, la sensibilidad analítica difiere considerablemente entre los diversos ensayos debido fundamentalmente a la falta de estandarización entre los diferentes laboratorios (93, 94). Además del método utilizado, otros factores como el contenido tumoral, la contaminación de las células inflamatorias y del estroma, la necrosis y la heterogeneidad tumoral podrían afectar a los resultados de metilación (95).

3. Biopsia líquida

3.1. Definición

La biopsia del tejido tumoral se considera la muestra de referencia para el diagnóstico del cáncer. Sin embargo, en ocasiones puede resultar difícil de obtener y sólo proporciona una instantánea de la enfermedad en un momento dado (96-98). Este sesgo fue confirmado en el estudio de Gerlinger *et al.* en el cual se analizaron porciones tomadas de diferentes partes de un tumor primario y sus metástasis demostrando la existencia de una extensa evolución intertumoral e intratumoral (99).

A la vista de estas limitaciones de las biopsias, los avances en la investigación del cáncer han permitido el desarrollo de nuevas herramientas que permiten analizar las alteraciones moleculares presentes en los tumores a través de la toma de muestras en fluidos corporales de forma no invasiva, concepto que se ha sido denominado como (96-98).

Por lo tanto, la biopsia líquida podría servir como alternativa en aquellos casos en que los tumores son difíciles de biopsiar. Además, ofrece la posibilidad de monitorización del paciente a lo largo de la enfermedad, permitiendo ajustar la terapia según la evolución del tumor (96-98). También, presenta la ventaja de reflejar la heterogeneidad del tumor, solventando las limitaciones que ofrece en ocasiones la biopsia de tejido (99).

El estudio de biopsia líquida centrado en el análisis de ADN se puede abordar mediante el empleo de ADN tumoral circulante (ADNtc), vesículas extracelulares (VE) y células tumorales circulantes (CTC) (**Figura 13**) (100). Todos ellos han mostrado utilidad en diversas investigaciones para detectar y monitorizar biomarcadores en cáncer (96-98). Se tratará a continuación con más detalle el ADNtc y de las VE por ser motivo de esta tesis.

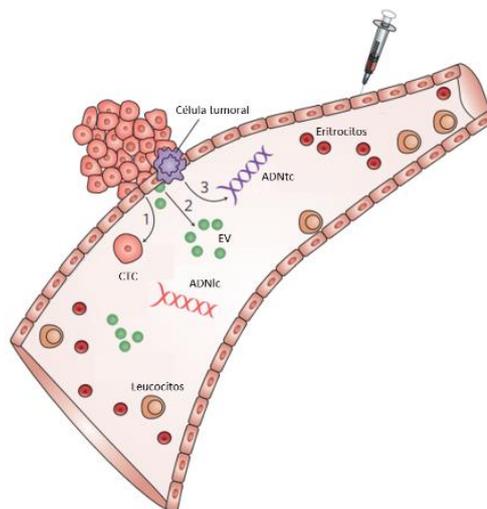


Figura 13. CTC, VE y ADNtc como biomarcadores basados en biopsia líquida. Modificado de (100).

3.2. ADN tumoral circulante

Generalidades

El ADN libre circulante (ADNlc) se identificó por primera vez en sangre en 1948 (101) pero los niveles séricos de ADNlc en pacientes con cáncer se caracterizaron 30 años después (102). La concentración de ADNlc se encuentra entre 0 y 100 ng/ml en sujetos sanos. Posteriormente, se demostró que la cantidad total de ADNlc era mayor en pacientes con cáncer, fluctuando entre 0 y > 1000 ng/ml (103, 104). Es importante tener en cuenta que el ADNtc comprende solo una fracción del ADNlc total, ya que el ADNlc también incluye el ADN liberado por células no tumorales (**Figura 14**). Según varios estudios, la fracción de ADNtc constituye ~ 0,1-89% del ADNlc siendo más elevado cuando mayor es la extensión tumoral (105, 106). El tamaño estimado del ADNlc varía entre 40-200 pares de bases (pb) con predominancia de fragmentos de tamaño entre 90 y 150 bp (107).

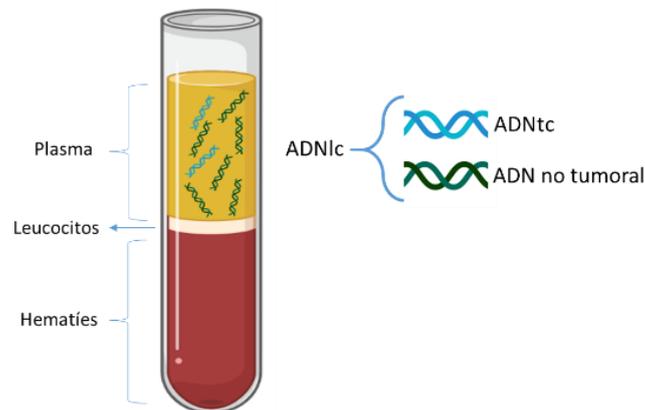


Figura 14. Representación de las fracciones formadas tras la centrifugación de sangre recogida en tubo de EDTA. En la fase inferior se depositan los hematíes, en la intermedia los leucocitos y en la fase superior el plasma. El ADNlc que se encuentra en la fracción de plasma y está formado por ADN tumoral circulante (ADNtc) y ADN no tumoral, siendo el ADNtc una parte minoritaria del ADNlc.

Consideraciones preanalíticas

- ... @ ... " Instituto Nacional del Cáncer publicó en 2020 pautas sobre los procedimientos óptimos para el manejo del ADNlc (108). El BBRB indica que para los ensayos de ADNlc se debe usar plasma con ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) como anticoagulante en lugar del suero (108). El suero (sin anticoagulante) presenta niveles más altos de ADNlc debido a la lisis de los leucocitos durante el proceso de coagulación que ejerce un efecto dilucional en el ADNtc, afectando negativamente a la detección de este (109-111). Los tubos de EDTA se podrán emplear siempre que se procesen en menos de 4 horas desde su extracción (108). Alternativamente, se pueden utilizar tubos especializados que evitan la lisis celular (tubos PAXgene, tubos BCT o Streck) que permiten el almacenamiento de plasma sanguíneo hasta 3 días a temperatura ambiente (109, 110, 112).

Además, se recomiendan dos pasos de centrifugación y almacenar las muestras de plasma a °C, no siendo recomendada la realización de múltiples ciclos de congelación y descongelación (110).

Utilidad del ADNtc

El uso del ADNtc ha evolucionado pasando de ser preferentemente una herramienta en investigación básica a ser una valiosa fuente de uso clínico, mostrándose como una prueba no invasiva reproducible (99) y siendo por tanto la primera opción para la biopsia líquida.

En la revisión de Siravegna *et al.* se confirma que los perfiles de ADNtc coinciden estrechamente con los de los tumores correspondientes y se puede utilizar para monitorizar la respuesta al tratamiento, evaluar la aparición de resistencia a los medicamentos y cuantificar la enfermedad residual mínima (113).

Los avances en la detección y caracterización del ADNtc han logrado la introducción en la práctica clínica de ensayos de biopsia líquida. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ya ha aprobado varios ensayos dirigidos a la identificación de un solo gen y, más recientemente, ensayos dirigidos a la identificación de varios genes a través de plataformas de secuenciación masiva (114).

Las ventajas que ofrece por tanto la biopsia líquida a través del empleo del ADNtc son múltiples, es una técnica bien validada, reproducible y que se correlaciona con los resultados clínicos en el tratamiento de los pacientes. Puede proporcionar información sobre la biología del tumor y revelar alteraciones de resistencia a determinados fármacos, además de presentar una asociación con el beneficio o la resistencia a terapia. Sin embargo, sus principales limitaciones se asocian a la dificultad de detección del ADNtc en muchos pacientes en estadios tempranos de la enfermedad y en algunos con cáncer en estadio avanzado ya que el ADNtc tiene una vida media corta en el torrente sanguíneo. Además, puede estar diluido por ADNtc procedente de células no tumorales y revelar mutaciones detectables que no son relevantes para la biología del cáncer (**Tabla 4**) (114, 115).

Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> - Técnica validada, reproducible y que se correlaciona con los resultados clínicos - Proporciona información sobre la biología molecular del tumor y revela alteraciones moleculares de resistencia a determinados fármacos 	<ul style="list-style-type: none"> - Indetectable en muchos pacientes con etapa temprana y algunos con cáncer en estadio avanzado - Vida media corta - La liberación no es exclusiva de células tumorales

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes del ADNtc.

ADNtc en glioblastoma

Bettegowda *et al.* publicaron en 2014 que menos del 10% de los pacientes con gliomas albergaban ADNtc detectable (105). En los gliomas, la presencia de ADNtc en el plasma es baja en comparación con otros tumores debido a que los gliomas son tumores que por su localización anatómica están protegidos por la barrera hematoencefálica (BHE) (**Figura 15**). La BHE es un sistema de protección formada por células endoteliales que recubren los capilares del cerebro y sirve para controlar y restringir el paso de moléculas entre la circulación sanguínea y el líquido cefalorraquídeo. Esta barrera física además de restringir el paso de sustancias tóxicas al cerebro limita la libre circulación de ADNtc, lo que explica la poca cantidad presente en sangre (105).

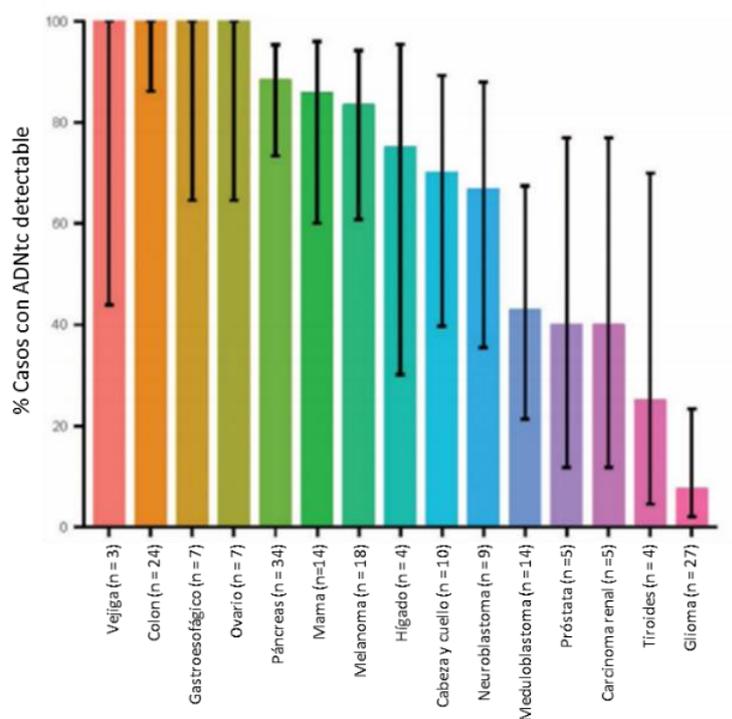


Figura 15. Porcentaje de casos con ADNtc detectable en varios tipos tumorales. Modificado de (105).

A pesar de esto, varios estudios han intentado detectar ADNtc en sangre de pacientes con GB. Sin embargo, la tasa de detección de alteraciones en sangre resultó modesta, lo que hace que esta metodología sea relativamente insensible en esta patología (116-121). Por ello, teniendo en cuenta su proximidad anatómica al parénquima cerebral y su utilidad para el diagnóstico de otras afecciones patológicas del SNC, se ha explorado el líquido cefalorraquídeo (LCR) como fuente alternativa de ADNtc. Diferentes trabajos han mostrado que el LCR ofrece una mayor posibilidad de detección de alteraciones genéticas en tumores del SNC en comparación con la sangre (122-125). La ventaja que ofrece es que la fracción de ADNtc es mayor en el LCR que en

el plasma, debido a la escasez de células normales que liberan su ADN directa o indirectamente en el LCR (126).

3.3. Vesículas extracelulares

Generalidades

Las vesículas extracelulares (VE) se citaron por primera vez en humanos en 1976 (127). Las VE son nanovesículas de 50 a 1000 nm secretadas por todos los tipos celulares y presentes en todos los tipos de fluidos biológicos. Están formadas por una bicapa lipídica que rodea una carga de proteínas, ácidos nucleicos (ARNm, miARN, ADN y ADN mitocondrial) y metabolitos y (Figura 16) (109, 128).

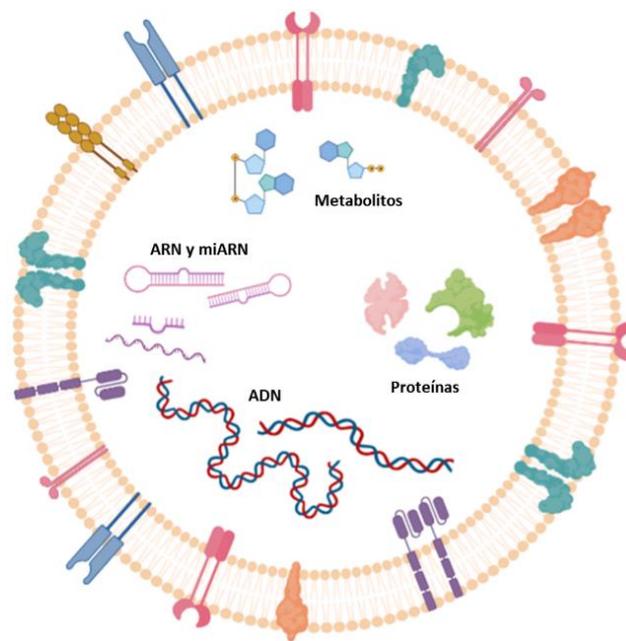


Figura 16. Composición de las VE.

Los componentes de la membrana de las VE consisten en lípidos, carbohidratos y proteínas que varían en los niveles de colesterol, esfingolípidos y fosfatidilserinas según el tipo de célula productora. Los carbohidratos, incluidas las sialoglicoproteínas y los N-glicanos, participan principalmente en la interacción con las células receptoras. Las proteínas de membrana pueden variar según el tipo de células originales y se observan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, proteínas de integrina y tetraspaninas como CD9, CD63, CD81, Alix y EpCAM que desempeñan funciones esenciales como presentación de antígenos, tropismo y moléculas marcadoras, respectivamente (129).

Las VE, según su tamaño y el proceso de biogénesis, se subdividen en exosomas o microvesículas. Los exosomas son VE de 50 a 150 nm derivadas de un endosoma multivesicular

(MVE). Por el contrario, las microvesículas son VE de mayor tamaño, de 150 a 1000 nm generadas por desprendimiento de la membrana plasmática (**Figura 17**) (128).

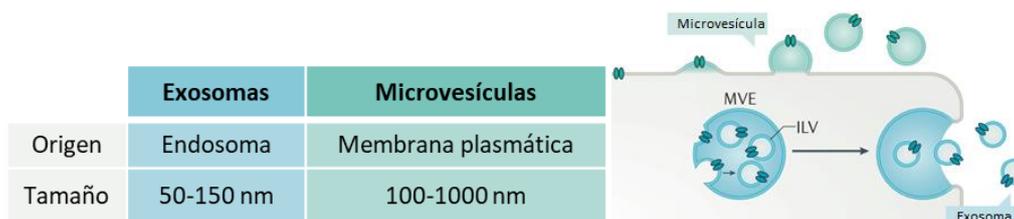


Figura 17. Formación de VE. MVE: endosoma multivesicular. ILV: Vesícula intraluminal. Modificado de (128).

Aunque numerosos estudios han demostrado la presencia de proteínas y ARN en los exosomas, pocos estudios informan de la presencia de ADN exosomal (exoADN). Sin embargo, se ha demostrado que los exosomas contienen de 100 bases a 17 kilobases de ADN bicatenario (130, 131). Thakur *et al.* demostraron que la mayoría de los exosomas de las células tumorales contienen ADN genómico de doble hebra que refleja las mutaciones identificadas en el tumor de procedencia (130). Sin embargo, el mecanismo por el cual el ADN se transporta a los exosomas sigue sin estar claro. Algunos estudios han sugerido que una vía de reparación del ADN desregulada en las células tumorales permite que el ADN se acumule en el citoplasma (en comparación con las células sanas), haciendo así que el ADN esté disponible para entrar en los exosomas (132, 133). Dependiendo de las condiciones experimentales y el tipo de célula, se han encontrado fragmentos de ADN monocatenarios o bicatenarios en el interior o en la superficie de las VE (131, 133, 134).

Consideraciones preanalíticas

Las variables preanalíticas afectan considerablemente el resultado y la reproducibilidad de los experimentos con VE (135-137). Para aislar las VE de la sangre, el plasma (tubo con anticoagulante) es la matriz recomendada por Coumans *et al.* ya que durante la coagulación que se produce en los tubos sin anticoagulante utilizados para la recogida de suero, las plaquetas producen una cantidad creciente de VE que podría resultar hasta en un 50% más de VE (135). A pesar de esta información, aún hay muchos artículos en los que el suero es la muestra de partida para el aislamiento de VE (138-141). Jamaly *et al.* recomiendan el citrato como mejor anticoagulante para minimizar la liberación de VE por parte de las plaquetas (136). Sin embargo, Birgit Fendl *et al.* observaron que una suave agitación resulta en una fuerte liberación de vesículas derivadas de plaquetas en sangre anticoagulada con citrato o heparina, mientras que los recuentos de vesículas permanecieron más estables tras la anticoagulación con EDTA (137).

Además, al elegir un anticoagulante se debe tener en cuenta no solo el grado de liberación de VE sino también los ensayos posteriores previstos, ya que la heparina puede inhibir la PCR (142, 143).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en investigaciones previas son controvertidos y aún se necesitan investigaciones adicionales para resolver las cuestiones importantes de cuál es la mejor matriz para el aislamiento de VE. La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) desaconseja el uso de heparina como anticoagulantes e indica que la elección de un anticoagulante alternativo es complicada y depende de los ensayos posteriores previstos (144).

Las recomendaciones con mayor acuerdo indican dos centrifugaciones ya que esto es esencial para la eliminación de plaquetas. El plasma debe prepararse en un tiempo máximo de 2 horas y puede congelarse a -20°C y -80 °C hasta un año, sin afectar el tamaño y la concentración de VE (109, 145). Sin embargo, cuando se separan las VE deben congelarse a -80°C lo más rápido posible (109, 144, 146).

Utilidad de las VE

Las VE también llevan una carga molecular específica que representa la célula de origen por lo que son marcadores derivados de diversas patologías y se consideran actualmente un área de gran interés en biopsia líquida por su capacidad para concentrar, transportar y proteger estas moléculas en los fluidos biológicos. Los avances recientes han demostrado las múltiples funciones de las VE en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos, destacando su potencial para servir como biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades, así como agentes terapéuticos (147).

En las últimas dos décadas, la transferencia de moléculas mediante VE se ha descubierto como un mecanismo crítico de comunicación intercelular entre las células tumorales y las células estromales de microambientes locales y distantes. En consecuencia, las VE juegan un papel esencial tanto en el crecimiento del tumor primario como en la evolución metastásica. También participan en múltiples procesos fisiopatológicos sistémicos, como la coagulación, la filtración vascular y la reprogramación de las células receptoras del estroma para apoyar la formación de nichos metastásicos, así como procesos de resistencia a tratamientos (148).

En este sentido, las VE son también una fuente de transporte de diversas moléculas derivadas de tumores, como fragmentos de ADN y ARN, oncoproteínas o miARN, por lo que pueden servir como una fuente de biomarcadores proporcionando información esencial en el diagnóstico, pronóstico y monitorización del cáncer. Sin embargo, a pesar de la abrumadora evidencia sobre

la contribución de las VE en esta área, hasta ahora solo un número limitado de estudios ha informado biomarcadores asociados a las VE, siendo la mayoría de ellos asociados a proteínas o miARNs (139-141, 149-153). Sin embargo, es importante destacar que, aunque aún son pocos los estudios que emplean exoADN para la detección de biomarcadores, se ha demostrado que las VE portan fragmentos de ADN con mutaciones somáticas derivadas de tumores que pueden detectarse en la circulación de los pacientes (130, 154-157).

Otra aplicación emergente es el uso de las VE como vectores para la liberación de compuestos o modulación de las funciones celulares. Por su composición, las VE son biocompatibles y presentan una baja inmunogenicidad y por lo tanto se presentan como vehículos atractivos para guiar terapias ya que es poco probable que desencadenasen respuestas inmunes innatas y adaptativas (128, 158). Ya existen ensayos en curso basados en la manipulación in vitro de VE con una carga en particular (por ejemplo, ARN interferentes, miARN y fármacos) para luego administrarlo a la célula diana como futuros tratamientos (128, 159). Además, es posible modular la especificidad y dirigir las VE a las células receptoras, clave para su uso como terapia dirigida. Este enfoque ya ha sido probado para optimizar la entrega de ARN pequeño de interferencia (del inglés, siRNA) al SNC en schwannoma (160) y alzhéimer (161). Asimismo, ya se ha demostrado también que las VE secretadas por células inmunes pueden estimular el sistema inmunológico y, por lo tanto, esta área puede ser explotada como vacunas antitumorales (162, 163).

Entre las ventajas que proporciona el uso de las VE se encuentra la estabilidad que ofrecen las vesículas para mantener la integridad de su contenido, así como el contenido de las mismas, que puede servir para estudios genómicos, proteómicos o metabolómicos. Además, pueden ser también útiles como vectores de diversas terapias. Sin embargo, existen también ciertas desventajas de su empleo en biopsia líquida, principalmente asociadas a las limitaciones metodológicas por falta de estandarización de protocolos y a las dificultades técnicas que supone el aislamiento, purificación y caracterización de VE (**Tabla 5**) (115, 164, 165).

Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> - Estabilidad de las VE para mantener la integridad de su contenido así como el contenido de las mismas - Útiles como vectores de diversas terapias 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitaciones metodológicas por falta de estandarización de protocolos - Dificultades técnicas en el aislamiento, purificación y caracterización de VE - La liberación no es exclusiva de células tumorales

Tabla 5. Ventajas e inconvenientes del uso de VE.

ExoADN en glioblastoma

Los exosomas de GB se liberan localmente en el microambiente del tumor y pueden diseminarse por todo el organismo ya que se han encontrado circulando en el líquido cefalorraquídeo y en el torrente sanguíneo (133, 166). Esto es así porque la bicapa lipídica de los exosomas permite su paso a través de la BHE y puede detectarse en la sangre periférica lo que proporciona un método mínimamente invasivo para su detección en comparación con las biopsias líquidas obtenidas del LCR (167).

En el contexto neoplásico, las VE derivadas del tumor pueden inducir la progresión e infiltración del GB ya que mantienen la angiogénesis, inhiben la respuesta inmunitaria y participan en los procesos de resistencia a los tratamientos (168).

Osti *et al.* han demostrado recientemente que la concentración de VE en sangre era mayor en pacientes con GB en comparación con controles sanos. Al comparar las concentraciones de VE en diferentes puntos de tiempo de la enfermedad, un aumento en las concentraciones de VE se correlacionó con la recurrencia del tumor, lo que sugiere que los exosomas podrían ayudar a predecir la recurrencia de GB (169).

Se ha detectado que el exoADN obtenido en sangre de pacientes con diversos tipos de cáncer puede servir para detectar biomarcadores del tumor en sangre (156, 170, 171), sin embargo en el GB sólo García-Romero *et al.* han detectado con éxito mutaciones en el gen *IDH1* en los exosomas de sangre periférica de pacientes con gliomas de alto grado observando que correlacionaban con los resultados obtenidos de muestras quirúrgicas (167).

Por lo tanto, aún existe muy poca información sobre la presencia de exoADN de los fluidos corporales de pacientes con glioma, sobre la precisión de la detección de este, así como su utilidad en el pronóstico y monitorización de la enfermedad, aunque no existe duda sobre su destacado papel como fuente de biomarcadores circulantes prometedores.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS

El gen *MGMT* está sujeto a regulación epigenética y su silenciamiento a través de la metilación de islas CpG localizadas en su región promotora está asociado a una mejor respuesta al tratamiento con temozolamida en pacientes con GB. Sin embargo, la determinación de la metilación de *MGMT* aún no está estandarizada, lo que hace que su implantación en la práctica clínica sea una necesidad no cubierta debido a la falta de reproducibilidad existente entre las distintas técnicas.

En la era de la biopsia líquida, los datos obtenidos para los pacientes con GB en este ámbito aún son limitados. Teniendo en cuenta la mayor concentración y conservación de marcadores tumorales en el compartimento exosomal en pacientes diagnosticados de GB, la hipótesis general de esta tesis plantea que el uso del compartimento exosomal para la identificación del biomarcador epigenético *MGMT* en biopsia líquida proporcionaría mejores resultados en términos de sensibilidad y especificidad en comparación con el empleo del ADN circulante y serían fiel reflejo de los datos procedentes del análisis en tejido tumoral en dichos pacientes.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es por tanto el desarrollo de una técnica capaz de detectar la metilación del gen *MGMT* en biopsia líquida.

Los objetivos específicos son:

- **Objetivo 1:** Desarrollo y validación de una técnica cuantitativa de metilación que pueda ser empleada en biopsia líquida. Comparación respecto a la técnica clásica.
- **Objetivo 2:** Análisis del estado de metilación del gen *MGMT* en ADNlc procedente de pacientes diagnosticados con GB. Comparación de los resultados obtenidos respecto al ADN extraído de tejido.
- **Objetivo 3:** Análisis del estado de metilación de *MGMT* en ADN procedente de exosomas de pacientes diagnosticados con GB. Comparación de los resultados obtenidos respecto al ADN extraído de tejido y a los obtenidos en ADNlc.
- **Objetivo 4:** Monitorización de pacientes en biopsia líquida.

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes

En este estudio se incluyeron 125 pacientes con diagnóstico de GB recogidos de forma ambispectiva en el Hospital Universitario La Paz entre mayo de 2014 y marzo de 2021. Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Pacientes con consentimiento informado firmado.
- Pacientes mayores de 18 años.
- Estado funcional de 0 a 3 según el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG).
- Diagnóstico de GB confirmado histológicamente.

Se disponía de muestra de tumor en parafina tras el diagnóstico anatomopatológico en 119 de los pacientes. El porcentaje de células tumorales en el tejido fue evaluado previamente por un patólogo experto en esta patología para asegurar que el porcentaje tumoral era mayor del 50%. De todos los pacientes incluidos se recogió la información demográfica, así como el tipo de cirugía (resección completa, incompleta, biopsia o sin resección), el esquema de tratamiento, la SLP y la SG. De 61 de los participantes se recogieron muestras de sangre en tubo con EDTA como anticoagulante (Tubos K₂EDTA, Vacutainer®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) previo al inicio del tratamiento. Se empleó muestra de sangre de 21 pacientes para el estudio de ADNlc y de 53 pacientes para los estudios de exoADN. Sólo de 13 pacientes hubo muestra de sangre suficiente para hacer en paralelo los estudios de ADNlc y exoADN. Además, en 8 de los pacientes se obtuvo sangre en tubo de suero (Tubos SST o tubos separadores de suero sin anticoagulante, Vacutainer®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). En 10 pacientes se recogió también sangre en tubo de EDTA a lo largo de la evolución de la enfermedad (**Figura 18**).

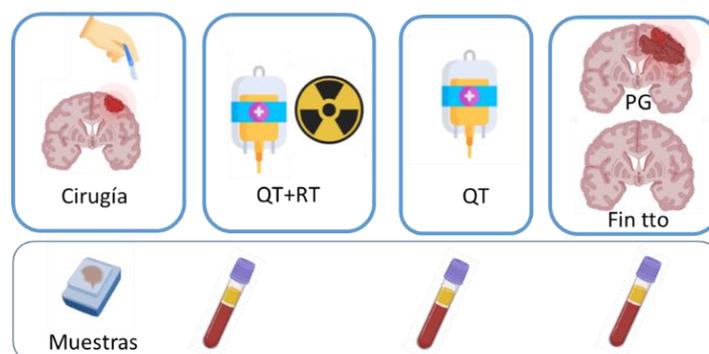


Figura 18. Esquema representativo de las muestras recogidas en el estudio.

Este estudio fue realizado bajo la aprobación del comité de ética del Hospital Universitario La Paz con el código PI-2887.

2. Líneas celulares

Se utilizaron 5 líneas celulares (HEK293T, A2780, H23, H460 y OVICAR) para establecer la relación entre la metilación del gen *MGMT* y su expresión. Las líneas celulares se adquirieron de la ATCC (del inglés, *American Type Culture Collection*) (Manassas, EE. UU.) o de la ECACC (del inglés, *European Collection of Authenticated Cell Cultures*) (Sigma-Aldrich, España) y se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones con RPMI (Corning) o DMEM (Gibco). Los medios se suplementaron con 2 mM de glutamina, gentamicina (50 µg/ml, Cellpure), anfotericina B (250 µg/ml, Corning) y 10% de SFB (suero fetal bovino).

3. Procesamiento de las muestras de sangre

El plasma se obtiene tras la centrifugación de una muestra de sangre que procede de un tubo con anticoagulante mientras que el suero procede de un tubo sin anticoagulante. Los tubos de sangre obtenidos se procesaron de la misma manera para obtener plasma o suero.

El plasma o suero se separa de los leucocitos y los hematíes mediante centrifugación a 2500 g durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se pasa el plasma o el suero a un tubo nuevo y se vuelve a centrifugar durante 20 minutos a 35.000 g a 4°C para eliminar las plaquetas. Las muestras de plasma y suero se almacenaron a -80°C en alícuotas de 1,5 ml para su procesamiento posterior (**Figura 19**).

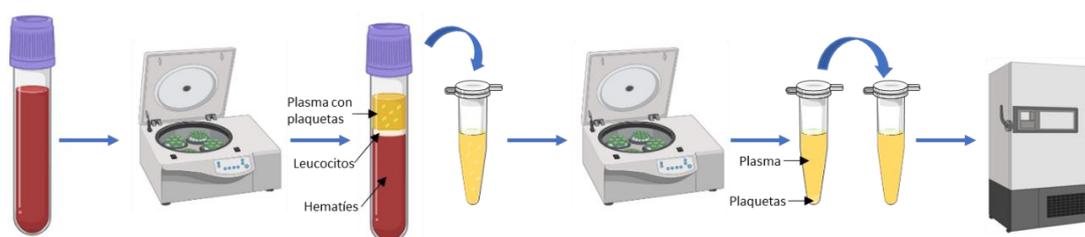


Figura 19. Protocolo de preparación de las muestras de sangre.

4. Aislamiento de exosomas

El proceso más común de aislamiento de exosomas es mediante el empleo de la ultracentrífuga. Esta técnica se fundamenta en una cámara al vacío refrigerada que contiene un rotor que gira a

alta velocidad generando fuerzas centrífugas que pueden llegar a 1.000.000 g. Cada molécula sedimenta a una determinada fuerza centrífuga según su densidad.

Una alícuota de 1,5 ml de cada muestra de plasma se descongeló y se filtró con un filtro estéril de polietersulfona de 0,2 μ M (Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.) para eliminar las partículas de tamaño superior. Posteriormente se diluyó el plasma hasta 7 ml con PBS (tampón fosfato salino) filtrado con un filtro de las mismas características. El plasma es diluido en PBS porque este paso reduce la viscosidad y aumenta la eficiencia del aislamiento de VE (172).

La muestra se introdujo entonces en tubos de policarbonato de pared gruesa de 13,5 ml reutilizables específicos para el proceso de ultracentrifugación. A continuación, el plasma se ultracentrifugó a 100.000 g durante 70 minutos a 4°C en un rotor de ángulo fijo (Rotor 70.1 Ti, factor K de 36) en una ultracentrífuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter, EE. UU.). El sedimento se lavó con 7 ml de PBS filtrado y se ultracentrifugó de nuevo en las mismas condiciones. El

PBS filtrado (**Figura 20**).

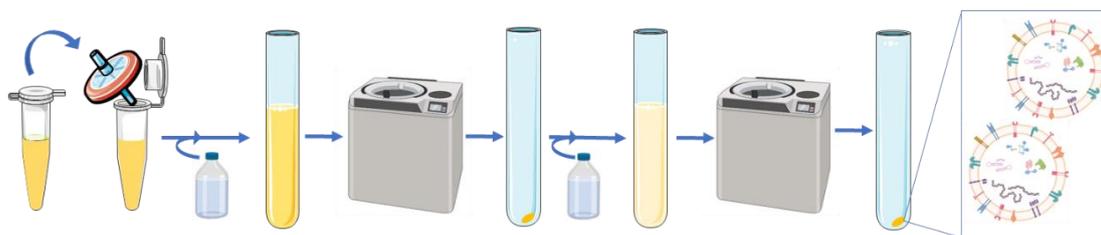


Figura 20. Protocolo de aislamiento de exosomas.

5. Caracterización de exosomas

El documento de Théry *et al.* recomienda la caracterización de exosomas con al menos dos métodos independientes. Por lo tanto, en este trabajo se han empleado el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA, del inglés *Nanoparticle Tracking Analysis*) utilizando el equipo Nanosight LM10 y la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) (173).

Análisis de rastreo de partículas

El NanoSight LM10 (Malvern, Reino Unido) es una tecnología basada en el análisis de rastreo de nanopartículas que resulta útil para caracterizar nanopartículas en solución desde 10 a 1000 nm, proporcionando datos del tamaño de las partículas y de su concentración en solución.

El movimiento aleatorio de cada partícula en un fluido o movimiento browniano se rastrea en una cámara de vídeo a través de un microscopio, capturando la luz dispersada por las partículas cuando son iluminadas por un láser. Se realiza un seguimiento simultáneo de todas las partículas pero siguiendo cada partícula individualmente. La tasa de movimiento browniano está relacionada con el tamaño de las partículas que se calcula utilizando la ecuación de Stokes-Einstein (**Figura 21**).

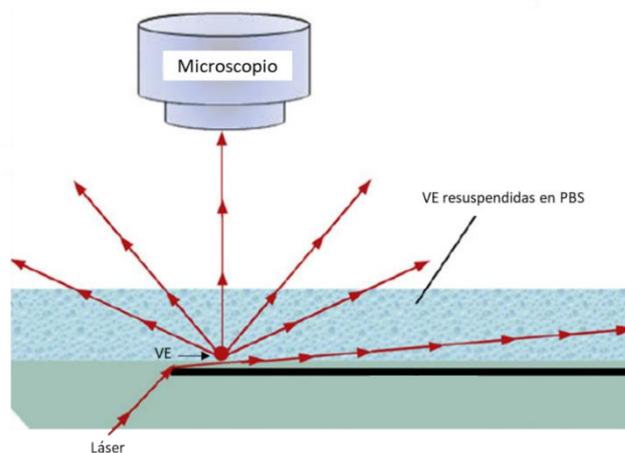


Figura 21. Esquema de funcionamiento del Nanosight. Modificado de (174)

A partir de 10 μl de la suspensión de exosomas obtenidos tras ultracentrifugación (volumen total 150 μl), se realizó una dilución 1:100 con PBS filtrado para tener nuestra muestra en el rango de medida recomendado por el fabricante del Nanosight (10^8 - 10^9 partículas/ml). Esta dilución fue inyectada en el NanoSight LM10. El análisis de cada muestra se realizó en el programa NTA 3.0 generando 2 vídeos de 60 segundos para cada muestra para obtener datos sobre la distribución de tamaño de las partículas y la concentración.

Microscopía electrónica de transmisión

La morfología de los exosomas se confirmó mediante MET en el Servicio de Microscopía electrónica de transmisión de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Para los experimentos de microscopía, 50 μl del pellet de exosomas se resuspendieron en 50 μl de paraformaldehído (PFA) al 4% (PH=7,2) en PBS. Se formó una gota con 5 μl de la suspensión de exosomas sobre parafilm y se colocó una rejilla de formvar/carbono sobre la gota durante 20 minutos para que los exosomas se adsorban a la rejilla (**Figura 22**). A continuación, se lava la rejilla con PBS 5 veces durante 1 minuto y se fija con 50 μl de glutaraldehído al 1% en PBS y posteriormente se lava la rejilla con agua (8 veces, 2 minutos).



Figura 22. Protocolo de preparación de muestras para MET.

Una vez fijados los exosomas en la rejilla se realiza el contraste, para ello se coloca la rejilla sobre una gota de uranil-oxalato durante 5 minutos. Después se pasa la rejilla a una gota de metilcelulosa-uranil-acetato durante 10 minutos en hielo. Finalmente se adsorbe el reactivo sobrante con papel Whatman y se deja secar la rejilla a temperatura ambiente para su posterior visualización en el ME. Se adquirieron las imágenes de los exosomas usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 (Tokio, Japón) empleando un voltaje de 100 kV y 100.000 aumentos. Se utilizó el programa DigitalMicrograph para la visualización y el procesamiento de las imágenes.

6. Aislamiento de ácidos nucleicos

Se desparafinaron muestras de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE) usando xileno. El ADN de las muestras de tejido, así como el ADN de las células y el exoADN, se extrajeron de acuerdo con protocolos estándar utilizando fenol-cloroformo, cloroformo y finalmente resuspendiendo en TE (175). El ADNlc se aisló empleando el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen, Alemania).

La extracción de ARN total se realizó empleando el método clásico de tiocianato de guanidinio, que conserva la integridad del ARN al inhibir la actividad RNAasa al momento de romper las células (176). El ARN fue resuspendido en 50 µl en agua libre de RNAasas para su posterior utilización.

Los ácidos nucleicos se cuantificaron empleando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific Inc., EE. UU.)

7. Modificación del ADN con bisulfito

La modificación con bisulfito fue desarrollada por Frommer *et al.*, en 1992 y actualmente sigue siendo la técnica estándar para el análisis de metilación del ADN (85). El proceso se basa en el tratamiento del ADN con bisulfito de sodio para convertir las citosinas no metiladas en uracilos que se transformarán en timinas en la posterior amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios.

secuencias utilizadas en dirección 5'-3' para la PCR de las muestras de parafina fueron las siguientes: cebador directo (BS_F) GGATATGTTGGGATAGTT y cebador inverso (BS_R) CCGAAAAAAAACTAAACAACACCT.

En las muestras de biopsia líquida se empleó un cebador reverso alternativo (BS_R2) con la siguiente secuencia, CCTACAAAACCACTCRAAACT que da lugar a un fragmento menor (166 pb), ya que el ADN procedente de este tipo de muestras suele estar fragmentado y es de menor tamaño. Las condiciones de esta PCR fueron: 94°C durante 5 minutos, seguidas de 40 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 54°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y 72°C durante 8 minutos.

Los productos amplificados resultantes se emplearon como muestra de partida para las posteriores PCR que se indican a continuación (**Figura 24**).

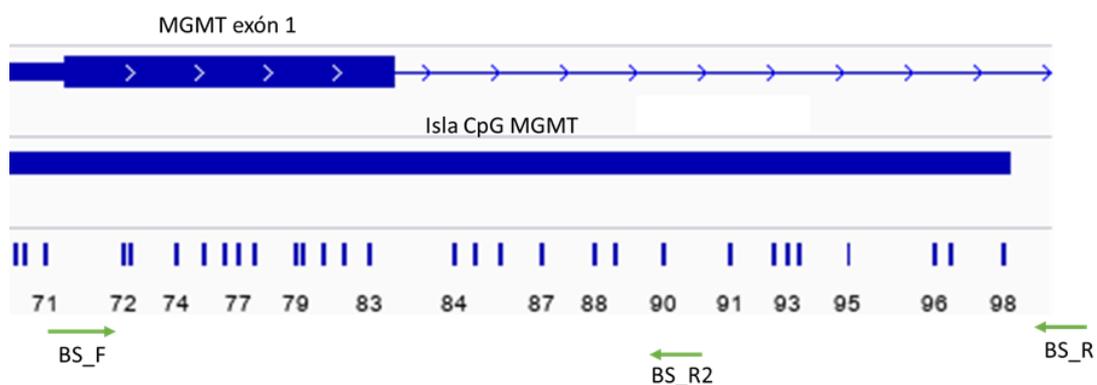


Figura 24. Isla CpG de *MGMT* y ubicación de los cebadores de la PCR de amplificación. El ADN procedente de las muestras de tejido se amplifica con el cebador BS_R mientras que para el ADN procedente de muestras de sangre se empleó el cebador BS_R2.

9. PCR específica de metilación (MSP)

El estado de metilación de *MGMT* de las muestras de tejido de los pacientes se determinó en la rutina clínica de nuestro hospital por MSP. Los amplicones resultantes de la PCR anidada se amplificaron utilizando cebadores específicos que discriminan el ADN metilado (M) y no metilado (NM) de acuerdo a lo descrito previamente por Esteller *et al.* (43).

Las secuencias de cebadores para las reacciones de PCR M y NM fueron las siguientes: para la secuencia metilada MGMT_MF, TTTCGACGTTCTAGGTTTTTCGC; MGMT_MR, GCACTCTCCGAAAACGAAACG y para la secuencia no metilada MGMT_UF, TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT; MGMT_UR, AACTCCACACTCTCCAAAAACAAAACA. Los cebadores para las reacciones NM eran análogos a las reacciones M, excepto que CG se reemplazó con TG en el cebador directo o CA en los cebadores inversos. Además, los cebadores

NM tienen pares de bases adicionales para poder distinguir ambas reacciones según su tamaño de amplicon en un gel de acrilamida. Se diseñaron cebadores para la detección de un fragmento de 81 pb obtenido de la reacción metilada y un fragmento de 93 pb de la reacción no metilada (**Figura 25**).

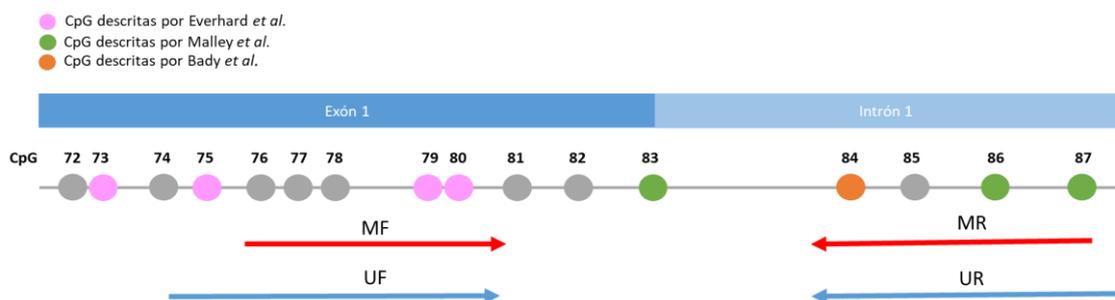


Figura 25. Isla CpG del gen *MGMT* y posiciones CpG descritas como relevantes por diferentes autores marcadas en color rosa, verde y naranja. Las flechas rojas representan los cebadores metilados y las flechas azules los cebadores no metilados.

La reacción de MSP se realizó en un volumen final de 25 μ l que contenía 1,1 μ l de amplicones resultantes de PCR anidada, 4,4 μ l de dNTP (10 mM), 0,4 μ l de cada cebador (100 ng/ μ L), 0,5 μ l de ADN polimerasa (Biotools ADN polimerasa 1U/ μ l) y 11,3 μ l agua. La reacción de MSP se llevó a cabo con los siguientes ajustes: para la reacción M, 37 ciclos de 95°C durante un minuto, 68°C durante un minutos y 72°C durante 50 segundos; para la reacción NM, 35 ciclos de 95°C durante un minuto, 60°C durante un minuto y 72°C durante 50 segundos. Los productos de MSP se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida no desnaturizantes al 6% con marcadores de tamaño apropiados y se analizó la presencia o ausencia de un producto de PCR bajo luz ultravioleta. Las muestras se clasificaron como metiladas cuando se observó una banda en la reacción que llevaba los cebadores metilados y se clasificaron como no metiladas cuando una banda estaba presente en la reacción no metilada. Se usó ADN procedente de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como control no metilado y ADN de PBMC metilado *in vitro* con la enzima CpG-metiltransferasa (M.SssI) como control metilado.

10. PCR cuantitativa específica de metilación

La PCR cuantitativa de metilación o qMSP es una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) que detecta en la misma reacción moléculas de ADN modificado con bisulfito metilado y no metilado de la misma ubicación cromosómica, específicamente en el área del promotor *MGMT*.

El ensayo qMSP se llevó a cabo en el equipo ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Alemania) utilizando los mismos cebadores que los utilizados para la técnica MSP. Además, diseñamos dos sondas de hidrólisis o sondas Taqman® específicas para identificar moléculas de ADN metiladas o no metiladas. La sonda de hidrólisis que detecta específicamente ADN metilado se marcó con un fluorocromo FAM en el extremo 5' (FAM-CAAATCGCAAACGATA-MGB-NFQ) y la sonda de hidrólisis de *MGMT* que detecta específicamente ADN no metilado se marcó con un fluorocromo VIC en el extremo 5' (VIC-CAAATCACAACAATA-MGB-NFQ). Ambas sondas tienen un marcador no fluorescente (NFQ, del inglés, *non-fluorescent quencher*) con un marcador de unión de surco menor en el extremo 3' (MGB, del inglés, *minor groove binder*). Las sondas de hidrólisis para las reacciones M y NM son idénticas, excepto en los sitios CpG, que son específicos para reconocer las posiciones M o NM (**Figura 26**).

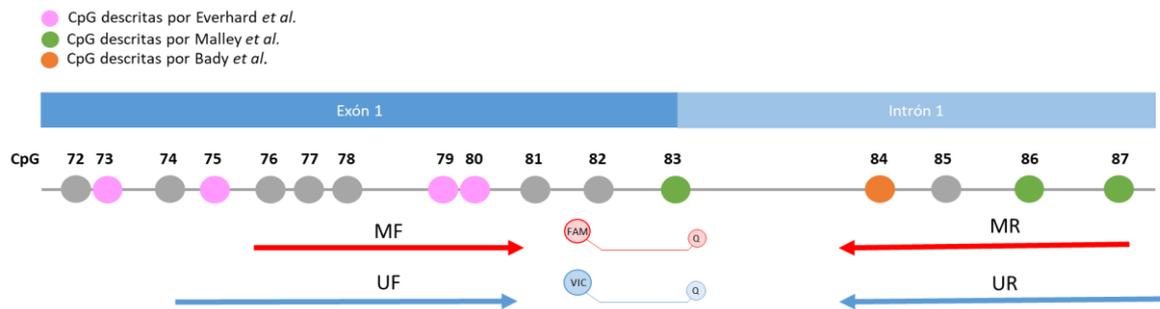


Figura 26. Isla CpG de *MGMT* y posiciones CpG descritas como relevantes por diferentes autores marcadas en color rosa, verde y naranja. Las flechas rojas representan los cebadores metilados y las flechas azules los cebadores no metilados. En medio de los cebadores están las sondas de hidrólisis.

La mezcla de amplificación Master Mix (QuantiTect Multiplex PCR Master Mix) se mezcló con agua destilada en un volumen final de 20 µl. Al igual que en las reacciones de MSP, se usó ADN procedente de PBMCs como control no metilado y ADN procedente de PBMCs metilado *in vitro* con la enzima CpG-metiltransferasa como control de ADN modificado por bisulfito y metilado. La reacción de qPCR implica una desnaturalización inicial a 95°C durante 15 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C durante un minuto y 60°C durante un minuto. La adquisición y el análisis de datos se realizaron en el software RQ Manager 1.2.1. El porcentaje de metilación se realizó utilizando la fórmula previamente descrita $= 100 / (1 + (2^{-(Cq_{\text{metilado}} - Cq_{\text{no metilado}})}))$ (177). Para las muestras de biopsia líquida se partió de 6 µl en vez de 3,5 µl.

11. Análisis de expresión del gen *MGMT*

Realizamos un análisis de expresión de *MGMT* en 5 líneas celulares para establecer la relación entre metilación y expresión.

1000 ng de ARN total se transcribieron en ADNc de acuerdo con protocolos estándar utilizando 4 µl de cebador aleatorio (100 µM), 4 µl de 5x script buffer, 1 µl de primeScript RT enzyme mix y 1 µl de oligodt primers (50 µM). La reacción se llevó a cabo en un termociclador a 37°C durante 15 minutos, 85°C 5 segundos, finalizando en 4°C.

La RT-PCR se realizó por triplicado utilizando el equipo ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Alemania). Se utilizaron los siguientes ajustes: 95°C 15 minutos seguido de 40 ciclos de 15 minutos a 95°C, 60°C un minuto. La reacción se llevó en un volumen total de 10 µl en el que se incluyó 2µl de Master Mix Solis Biodyne, 0,62 µl de sonda *GADPH* (Hs03929097_g1, Applied Biosystems) o *MGMT* (Hs01037698_m1, Applied Biosystems) 5,73 µl de agua y 1,66 µl de ADNc. La expresión génica relativa se determinó basándose en los ciclos de umbral del gen *MGMT* y del gen de referencia interno *GADPH* de acuerdo con el método de ciclo de umbral comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Se emplearon también dos muestras de tejido cerebral normal (CN1 y CN2) para conocer la expresión en cerebro normal respecto a la expresión en líneas celulares.

12. Análisis estadístico

Las muestras se clasificaron como metiladas (M) o no metiladas (NM) según el punto de corte determinado mediante el análisis de la curva ROC utilizando la técnica MSP como referencia. La concordancia entre variables dicotómicas se ha estudiado mediante la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y porcentaje de acuerdos observados (porcentaje de concordancia) con sus respectivos intervalos de confianza. También se ha analizado el índice kappa con su respectiva significación considerándose un método más robusto porque tiene en cuenta las coincidencias que ocurren por azar (178). La interpretación del índice kappa se indica en la **Tabla 6**:

Valor de k	Fuerza de la concordancia
0,21 - 0,40	Débil
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Buena
0,81 - 1,00	Muy buena

Tabla 6. Interpretación del índice kappa (178).

La asociación entre metilación y estado clínico-patológico (variables cualitativas) se analizó mediante la prueba de chi-cuadrado (tipo de cirugía, ECOG) o la prueba exacta de Fisher (sexo). Para la comparación entre metilación cualitativa y edad (datos cuantitativos), se utilizó la prueba t-student para datos independientes. Se utilizaron curvas ROC dependientes del tiempo o ROC(t) para evaluar y comparar el valor pronóstico del marcador de metilación *MGMT* entre MSP y qMSP en función del tiempo (179).

Los análisis de supervivencia se realizaron mediante el análisis de Kaplan-Meier y la regresión de Cox. Para comparar las funciones de supervivencia por grupos, se realizaron pruebas de log-rank. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando intervalos de confianza se realizaron utilizando un nivel de confianza del 95% (IC). El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.), R versión 4.0.0. y GraphPad 4.00.

Resultados

RESULTADOS

Esta sección se dividirá en diferentes apartados en función de los objetivos propuestos:

1. Desarrollo y validación de la técnica qMSP

En el caso de los biomarcadores es fundamental establecer que la prueba empleada para la detección del biomarcador es reproducible y reconoce exactamente la molécula que se pretende valorar (validación analítica) así como comprobar que el biomarcador es útil para el uso clínico propuesto (validación clínica).

1.1. Validación analítica

Relación entre el estado de metilación del promotor del gen *MGMT* y su expresión transcripcional en líneas celulares

Para el desarrollo de la técnica qMSP se diseñó una sonda de hidrólisis entre los dos cebadores que en conjunto incluían las posiciones CpG más relevantes descritas en la literatura asociadas a la expresión de *MGMT*. Se determinó el estado de metilación del promotor del gen *MGMT* en 5 líneas celulares, encontrando que sólo una de ellas presentaba el promotor de *MGMT* metilado (293T, 100% de metilación). Además, se analizaron los niveles de expresión del gen *MGMT* en estas líneas celulares observando ausencia de expresión en la línea 293T y presentando el resto de las líneas celulares no metiladas una expresión homogénea. En el análisis de expresión se incluyeron también dos muestras de tejido cerebral normal y se observó que la expresión obtenida en las líneas celulares no metiladas era similar a la obtenida en el tejido cerebral normal. Se realizó una regresión lineal para establecer la relación entre los porcentajes de metilación y los niveles de expresión, confirmando que presentaban una relación inversa ($R^2=0,96$) (Figura 27).

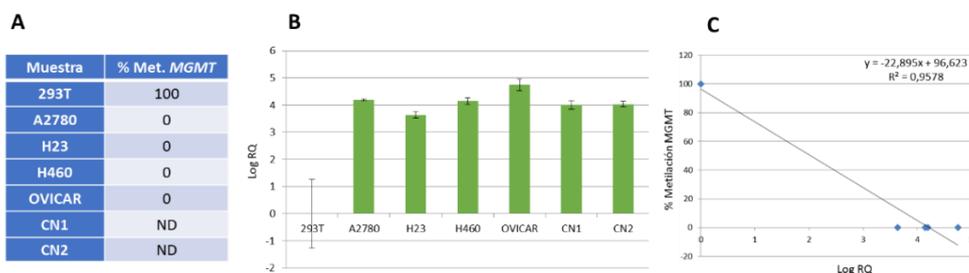
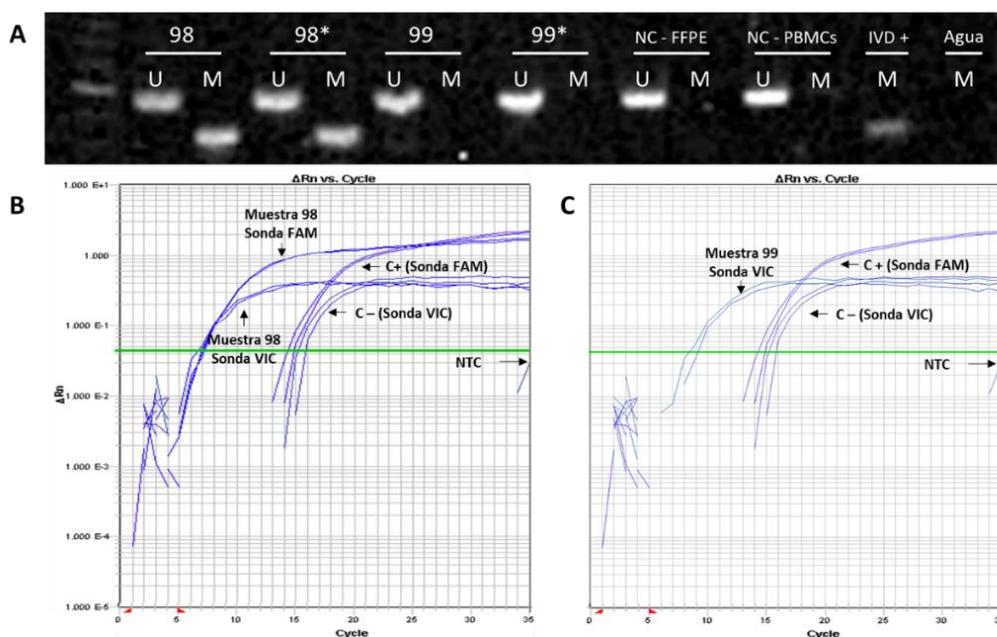


Figura 27. A: Porcentaje de metilación del promotor *MGMT* en las diferentes líneas celulares analizadas. **B:** Expresión transcripcional del gen *MGMT* en las diferentes líneas celulares y en el tejido cerebral normal. **C:** Relación entre la metilación y la expresión de *MGMT*. %Met: Porcentaje de metilación calculado con qMSP. CN1: Muestra de cerebro normal 1. CN2: Muestra de cerebro normal 2. RQ: cuantificación relativa.

Análisis comparativo de los resultados obtenidos con las técnicas MSP y qMSP.

Para llevar a cabo este estudio empleamos 100 muestras de tejido tumoral parafinado de pacientes diagnosticados con GB que fueron procesadas por la técnica habitual (MSP) y por la nueva técnica cuantitativa con doble marcaje (qMSP). La MSP da lugar a un resultado cualitativo expresado como presencia o ausencia de metilación del promotor de *MGMT* mientras que la técnica cuantitativa (qMSP) nos informa un resultado cuantitativo expresado como porcentaje de metilación entre las reacciones metilada y no metilada en la misma región analizada.

A continuación, mostramos un ejemplo de ambas técnicas en una muestra metilada para *MGMT* y otra no metilada. Igualmente se incorporan muestras de controles negativos de origen parafinado y de células mononucleares de sangre periférica, así como ADN metilado *in vitro* como control positivo y agua para descartar contaminación (**Figura 28**).



Tras la obtención de los resultados cuantitativos se realizó una curva ROC para determinar el mejor punto de corte para la técnica qMSP respecto a la técnica estándar MSP. La curva ROC (Característica Operativa del Receptor, del inglés, *Receiver Operating Characteristic*) es una representación gráfica de la sensibilidad frente a 1-especificidad. El área bajo la curva ROC (AUC, del inglés, *Area Under Curve*) puede tomar valores entre 0 y 1, cuanto mayor sea el AUC, mayor sensibilidad y especificidad tendrá la prueba.

El valor de AUC con un punto de corte de metilación de 3,75% fue de 0,962 (IC: 0,927 - 0,998) (**Figura 29**). Por lo tanto, las muestras fueron clasificadas como metiladas cuando el porcentaje de metilación \geq 3,75% y no metiladas cuando eran inferiores a este valor.

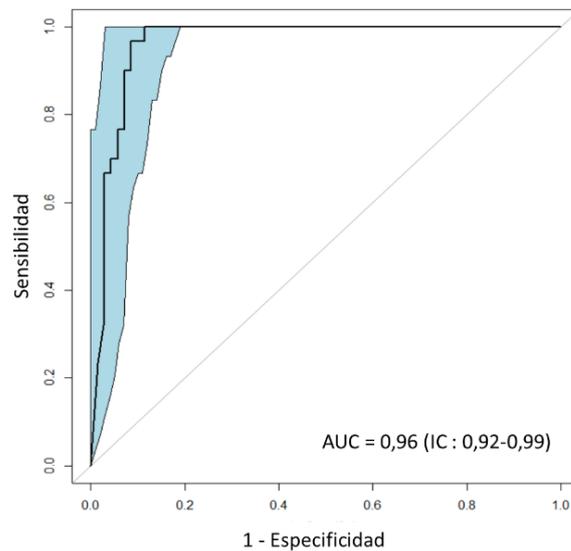


Figura 29. Curva ROC para qMSP comparada con MSP (n=100). AUC: Área bajo la curva. IC: intervalo de confianza del 95%. El color azul representa el intervalo de confianza.

Con la técnica MSP se detectó la presencia de ADN metilado en 30 de las 100 muestras analizadas mientras que por qMSP fue detectada en 38 de las 100 muestras. Si se considera la técnica clásica MSP como referencia, la sensibilidad y especificidad para este punto de corte en la qMSP fue de 100% (IC: 88,6 - 100) y de 88,6% (IC: 79,0 - 94,1), respectivamente. El valor predictivo positivo (VPP) fue de 78,9% (IC: 63,6 - 88,9) y el valor predictivo negativo (VPN) de 100% (IC: 94,2 - 100). La concordancia entre ambas técnicas fue del 92% (IC: 85,0-95,9).

También se empleó el índice kappa para evaluar la fuerza de la concordancia entre las dos técnicas. Este índice tiene en cuenta también el grado de acuerdo que pudiera existir por azar al analizar dos variables cuantitativas. El índice kappa resultó de 0,823, lo que indica que existe muy buena concordancia entre ambas técnicas, pudiendo considerarse como intercambiables.

Además, en 5 de las muestras discordantes en las que aún se disponía de ADN, se realizó una técnica de MSP alternativa de manera externa en el hospital MD Anderson, confirmado la presencia de metilación, aunque débil en 3 de las 5 muestras analizadas (muestras 1, 78, 100)

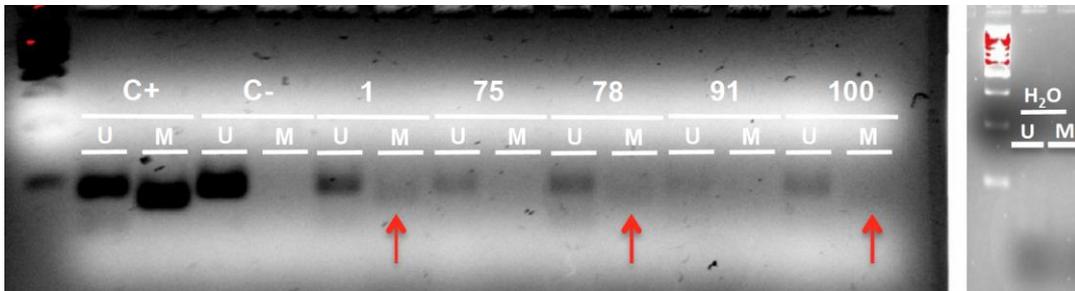


Figura 30. Gel de agarosa con la amplificación del promotor *MGMT* de cinco muestras con discrepancias entre MSP y qMSP realizada en la MD Anderson Madrid realizando la modificación por bisulfito con EpiTec y utilizando los siguientes cebadores y condiciones para la amplificación por PCR: MF: TTTCGACGTTTCGTAGGTTTCGC; MR GCACTCTCCGAAAACGAAAC; UF: TTGTTTTGATGTGTAGGTTTTTGT; UR: AACTCCACACTCTCCAAAAACAAAACA. Para ambas reacciones las PCR se realizaron a 58°C y 35 ciclos. Las flechas indican una ligera amplificación en la reacción de metilación en las muestras 1, 78 y 100.

1.2. Validación clínica

Dado que la presencia de metilación en la región promotora del gen *MGMT* se utiliza como biomarcador predictivo para identificar pacientes que tienen más probabilidades de responder a la terapia con TMZ, se estudió la relación de la metilación del biomarcador *MGMT* evaluado por ambas técnicas (MSP y qMSP) y su asociación con la SLP y la SG.

Características clínicas y demográficas

Se valoró el estado de metilación del gen *MGMT* por MSP y qMSP en una cohorte de 100 pacientes y se recogieron los datos clínicos y demográficos para poder evaluar el efecto de la variable metilación con ambas técnicas y el resto de las variables clínicas y demográficas.

Desde mayo de 2014 a marzo de 2020, se incluyeron 100 pacientes con diagnóstico de GB IDH no mutado de acuerdo con las características clásicas de necrosis y proliferación celular (**Figura 31**). Todos los pacientes incluidos recibieron tratamiento con el esquema STUPP.

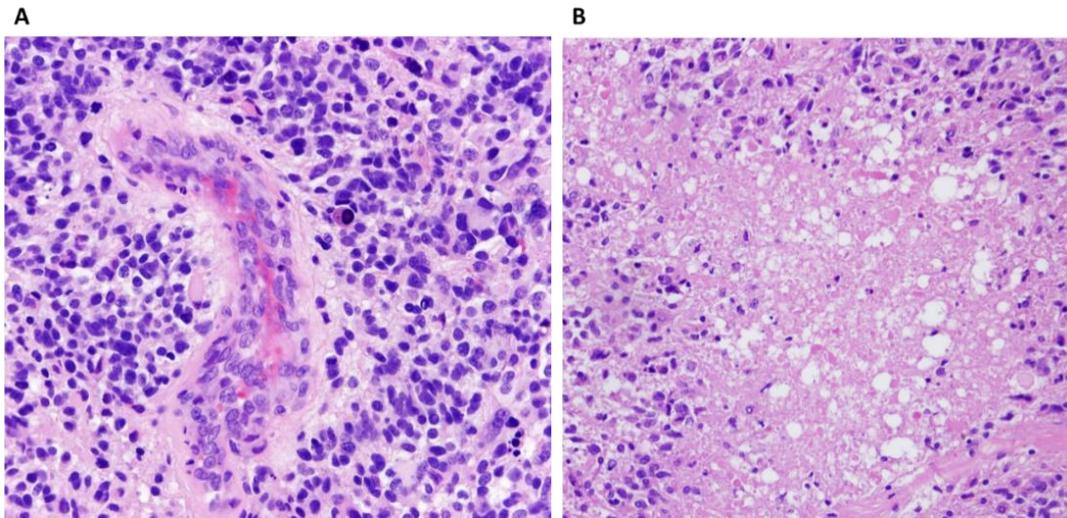


Figura 31. Características clásicas del diagnóstico anatomopatológico del GB. **A.** Proliferación microvascular con engrosamiento de los endotelios e imágenes de apoptosis y mitosis. **B.** Área de abundante necrosis.

De estos 100 pacientes, 42 eran mujeres y 58 hombres. La media de edad en el momento del diagnóstico fue de 61 años con un rango de edad entre 25 y 84 años. 13 de los pacientes habían tenido un cáncer previo y 7 de ellos habían recibido anteriormente quimioterapia. El 59% presentaba en el momento del inicio del tratamiento con quimio-radioterapia un ECOG de 0, 24% ECOG de 1, 12% ECOG de 2 y 5% ECOG de 3.

La mediana de SLP de nuestra cohorte fue de 9,8 meses (IC: 7,2-12,4) y el 86,2% de los pacientes presentó recurrencia antes de los 2 años (**Figura 31**).

Por su mal estado funcional, el 60% de los pacientes no fueron candidatos a recibir tratamiento a la progresión. El rescate quirúrgico se pudo llevar a cabo en 12 de los 100 pacientes. El tratamiento de elección a la recurrencia fue de fotemustina en 19 pacientes, 3 pacientes recibieron irinotecán y en 4 pacientes el tratamiento de elección fue bevacizumab (2 en monoterapia y 2 en combinación con lomustina). El retratamiento con TMZ se pudo dar en 8 pacientes mientras que un paciente fue incluido en un ensayo clínico en otro centro. A pesar de ello, la mediana de SG fue de 14,6 meses (IC: 11,1-18,0) y sólo un 30% de los pacientes seguía vivo a los dos años (**Figura 32**).

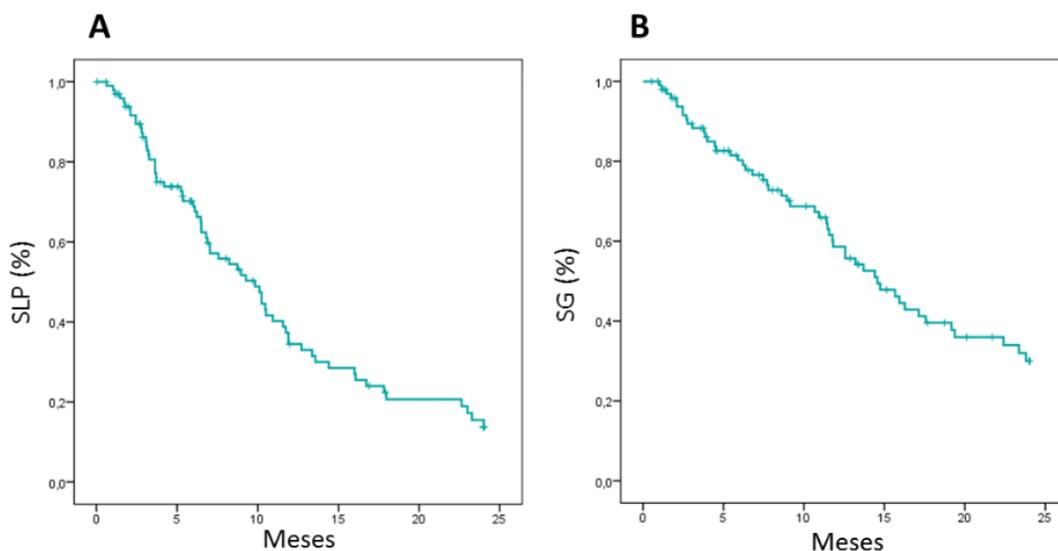


Figura 32. Curvas Kaplan-Meier de SLP (A) y de SG (B) de nuestra cohorte de 100 pacientes.

Al analizar la supervivencia por subgrupos, observamos que el tipo de resección impactó de forma significativa en la SLP (0,023). Fue posible la realización de resección macroscópicamente completa en el 51% de los pacientes, mientras que el 21% tuvieron una resección parcial o incompleta y en el 20% no fue posible la realización de la cirugía.

La mediana de SLP fue de 10,5 meses (IC: 8,4-12,5) en pacientes con resección macroscópicamente completa, 10,2 meses (IC: 4,9-15,7) en pacientes con resección incompleta y de 3,7 meses (IC: 0-8,2) cuando no fue posible la realización de la resección quirúrgica del tumor (**Figura 33**).

La mediana de SG fue respectivamente de 16,2 meses (IC: 11,1-21,4), 14,6 meses (IC: 8,4-20,7) y de 4,0 meses (IC: 0-13,8), observándose diferencias significativas entre los distintos grupos ($p=0,016$). Por lo tanto, la resección incompleta reduce el riesgo de exitus en un 54 % (HR=0,46; IC = 0,22-0,99; $p=0,05$) respecto a la biopsia mientras que la resección completa reduce el riesgo de exitus en un 63% (HR=0,37; IC = 0,18-0,75; $p=0,006$) (**Figura 33**).

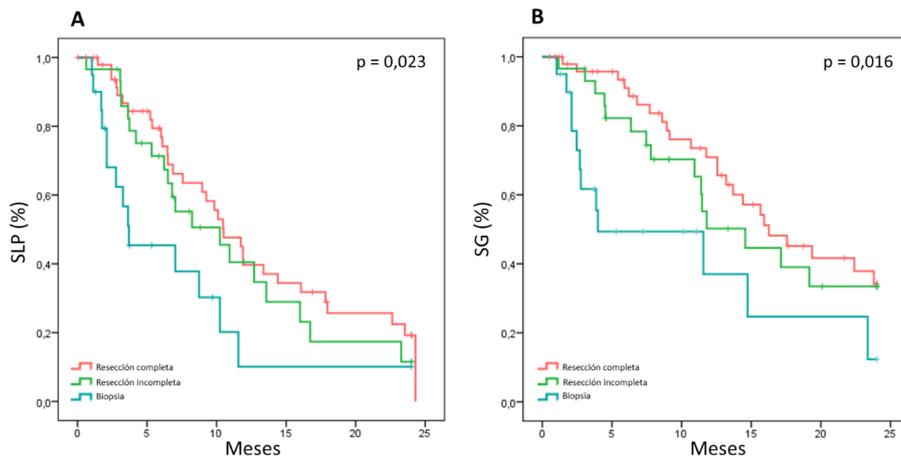


Figura 33. Curvas Kaplan-Meier de SLP (A) y de SG (B) de nuestra cohorte de 100 pacientes según el tipo de resección.

Tomando como referencia el grupo de resección completa, se obtiene que no existen diferencias significativas entre este tipo de resección y la resección incompleta ni en SLP ($p=0,519$) ni en SG ($p=0,500$).

De los 51 pacientes sometidos a resección macroscópicamente completa, de 48 disponían de informe de la RM postquirúrgica en la que se indicaba la presencia de restos tumorales, la existencia de restos dudosos o la ausencia de los mismos. Se observó que sólo en 18 de los pacientes no se apreciaron restos tumorales en la RM postquirúrgica a pesar de haber sido sometidos a una resección macroscópicamente completa. Al analizar la SLP en este subgrupo de pacientes de acuerdo con el resultado de la RM postquirúrgica, no se encontraron diferencias significativas ni en SLP ($p=0,544$) ni en SG ($p=0,773$) (**Figura 34**).

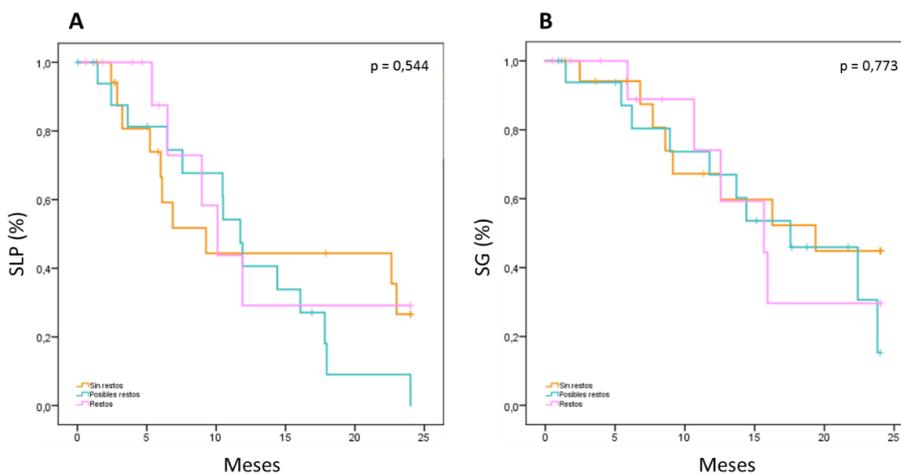


Figura 34. Curvas Kaplan-Meier de SLP (A) y de SG (B) de los pacientes con resección completa según el resultado de la RM postquirúrgica.

Respecto a la localización del tumor, la mayoría se encontraba en el lóbulo frontal (31%) mientras que en un 27% de los pacientes el tumor se extendía a varios lóbulos (**Figura 35**). No se encontraron diferencias significativas ni en SG ni en SLP respecto a lo localización del tumor (**Figura 35**).

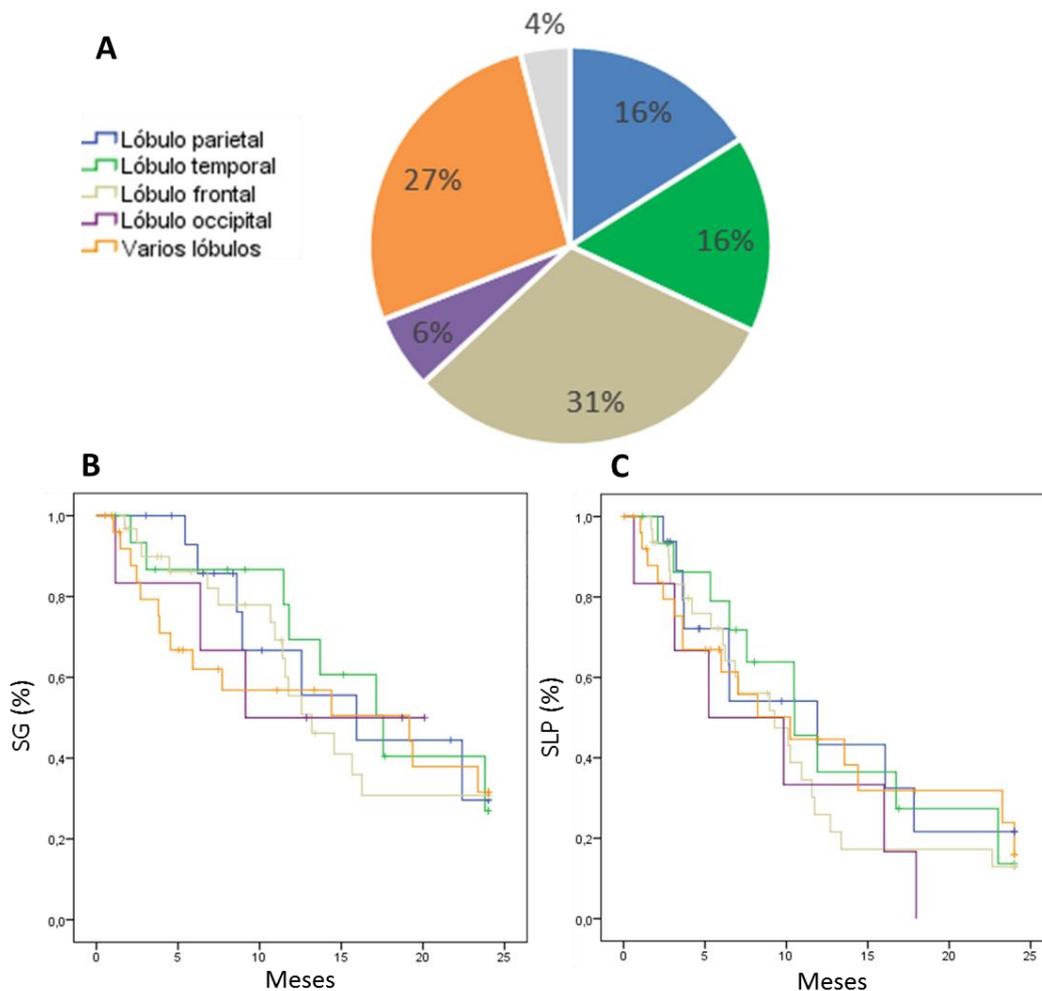


Figura 35. A. Gráfico circular con la localización anatómica de los GB en los 100 pacientes. B. Curva Kaplan-Meier de SG según la localización del tumor ($p=0,964$). C. Curva Kaplan-Meier de SLP según la localización del tumor ($p=0,746$).

La edad media de los pacientes fue de 61 años, con un rango que abarcaba desde los 25 a los 84 años. No se encontraron diferencias significativas entre la edad y la metilación calculada por MSP ($p=0,632$) y por qMSP ($p=0,697$). Cuando se evaluó la presencia de metilación del promotor del gen *MGMT* en función del resto de variables clínicas y demográficas tampoco se encontraron diferencias significativas entre el sexo, el tipo de cirugía, el ECOG y la metilación del promotor de *MGMT*, independientemente de la técnica utilizada, MSP o qMSP (**Tabla 7**).

Característica	N	MSP	qMSP	MSP (p-valor)	qMSP (p-valor)
Sexo					
Mujer	42	15 M 27 NM	19 M 23 NM	p = 0,377	p = 0,218
Hombre	58	15 M 43 NM	19 M 39 NM		
Tipo de cirugía					
Resección completa	51	19 M 32 NM	22 M 29 NM	p = 0,174	p = 0,367
Resección incompleta	29	8 M 21 NM	11 M 18 NM		
Biopsia	20	3 M 17 NM	5 M 15 NM		
ECOG					
0	59	17 M 42 NM	21 M 38 NM	p = 0,727	p = 0,624
1	24	7 M 17 NM	10 M 14 NM		
2	12	5 M 7 NM	6 M 6 NM		
3	5	1 M 4 NM	1 M 4 NM		

Tabla 7. Datos demográficos y clínicos de nuestra cohorte. M: metilado. NM: no metilado.

Metilación del gen *MGMT* como biomarcador predictivo de SLP y SG por MSP y por qMSP

El objetivo principal de un biomarcador predictivo a terapia es poder seleccionar a aquellos pacientes que más se van a beneficiar de un determinado tratamiento. Por lo tanto, se emplearon como variables principales de estudio la SLP y la SG. La SLP muestra la proporción de pacientes que se mantienen sin progresión de la enfermedad de acuerdo con los criterios RANO a lo largo de un tiempo definido desde el inicio del tratamiento. Por su parte, la SG evalúa el porcentaje de pacientes que siguen vivos transcurrido un período de tiempo definido desde que comenzó el tratamiento. En nuestro caso, el tiempo de seguimiento mínimo y máximo fue de 3 meses a 24 meses, respectivamente.

SLP y SG en función del estado de metilación de *MGMT* evaluada por MSP

Dado que los resultados previos indicaban que al menos el tipo de resección impactaba en la supervivencia, realizamos un modelo de Cox ajustado por las variables MSP, tipo de cirugía, edad, sexo y ECOG en base a la SLP. El modelo multivariante sólo reportó diferencias significativas en el modelo de COX para la variable MSP ($p = 0,001$). No obtuvimos diferencias significativas para las variables clínicas tipo de cirugía, edad, sexo y ECOG, $p=0,071$, $p=0,261$, $p=0,493$ y $p=0,497$, respectivamente. En el análisis de SG del modelo de Cox encontramos resultados similares, $p=0,091$, $p=0,165$, $p=0,746$ y $p=0,110$, respectivamente, solo obteniendo

diferencias significativas para la variable MSP ($p = 0,008$). Por lo tanto, realizamos un modelo univariante para evaluar de forma independiente el valor de esta variable MSP en la SG y la SLP.

La mediana de la SG medida por MSP en el grupo de pacientes con el promotor de *MGMT* no metilado fue de 11,8 meses (IC: 10,4-13,2) mientras que la mediana de la SG no se alcanzó en el grupo con el promotor metilado (**Figura 36**). Observamos diferencias significativas entre los grupos con presencia o ausencia de metilación en términos de SG ($p = 0,004$, HR = 0,37; IC: 0,19-0,72). Es decir, en los pacientes con presencia de metilación se reduce el riesgo de muerte en un 63%. La SG a los dos años en el grupo con ausencia de metilación fue del 17% en comparación con el 53% en el grupo con *MGMT* metilado.

La mediana de la SLP fue de 7,0 meses (IC: 5,3-8,8) en el grupo no metilado y de 18,0 meses (IC: 9,8 a 26,1) en el grupo con el promotor de *MGMT* metilado (**Figura 36**). Observamos también diferencias significativas en términos de SLP con respecto al estado de metilación entre grupos ($p < 0,001$, HR: 0,33, IC: 0,18 a 0,61). La tasa de SLP a los dos años fue de 9,2% y de 31,5% para los grupos con ausencia y presencia de metilación, respectivamente.

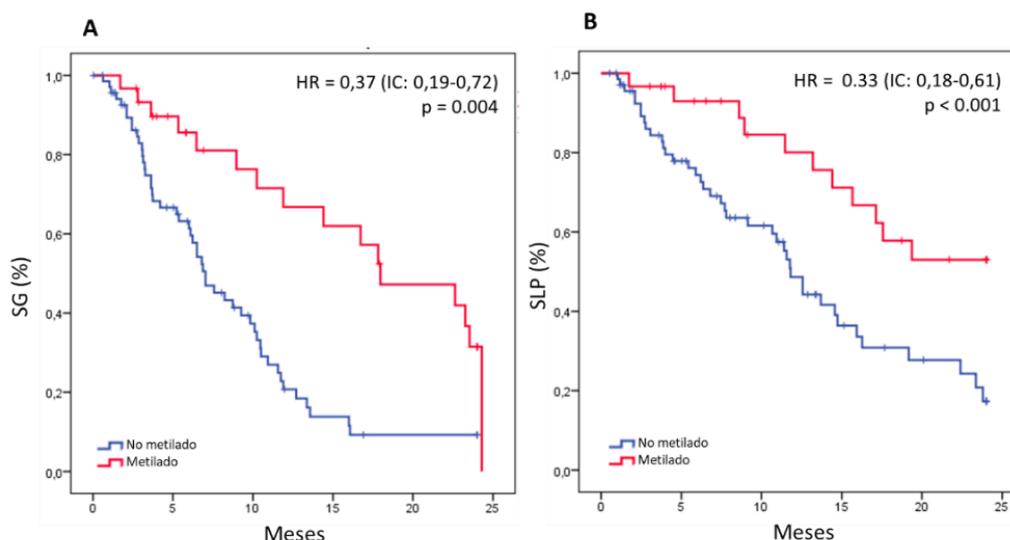


Figura 36. Análisis de supervivencia de nuestra cohorte de pacientes. **A.** Curva Kaplan-Meier de SG en función de la metilación de *MGMT* evaluada por MSP. **B.** Curva Kaplan-Meier de SLP en función de la metilación de *MGMT* evaluada por MSP.

SLP y SG en función del estado de metilación de *MGMT* evaluada por qMSP

De forma similar a los datos obtenidos para el MSP, en el modelo qMSP se realizó un ajuste basado en el modelo de Cox para las variables qMSP, tipo de cirugía, edad, sexo y ECOG. Sólo obtuvimos diferencias significativas en el modelo multivariante para la variable qMSP ($p=0,004$).

No obtuvimos diferencias significativas para las variables clínicas, $p=0,073$, $p=0,199$, $p=0,435$ y $p=0,474$, respectivamente. El análisis de SG del modelo de Cox encontró resultados similares, $p=0,073$, $p=0,143$, $p=0,854$ y $p=0,131$, respectivamente. Solo obtuvimos diferencias significativas en SG para la variable qMSP ($p=0,036$). Por lo tanto, realizamos un modelo univariante entre la variable qMSP y las variables SLP y SG.

Cuando la metilación de *MGMT* fue obtenida por qMSP, la mediana de la SG en el grupo con ausencia de metilación fue de 12,6 meses (IC: 10,0 a 15,1) mientras que la mediana no se alcanzó en el grupo que presentaba el promotor de *MGMT* metilado (**Figura 37**). De acuerdo con los resultados obtenidos por MSP, había diferencias significativas entre ambos grupos en términos de SG ($p=0,014$, HR=0,47, IC: 0,26 a 0,86) y SLP ($p=0,001$, HR= 0,41, IC: 0,24-0,70). La tasa de SG a los dos años fue del 19% en el grupo con ausencia de metilación comparado con el 45% obtenido para el grupo con presencia de metilación. La mediana de SLP fue de 7,0 meses (IC: 5,6-8,4) en el grupo con ausencia de metilación por qMSP y de 16,0 meses (IC: 11,8-20,3) en el grupo con presencia de metilación por qMSP (**Figura 37**). La tasa de SLP a los dos años fue de 10,8% y de 24,9% en los grupos con ausencia y presencia de metilación respectivamente.

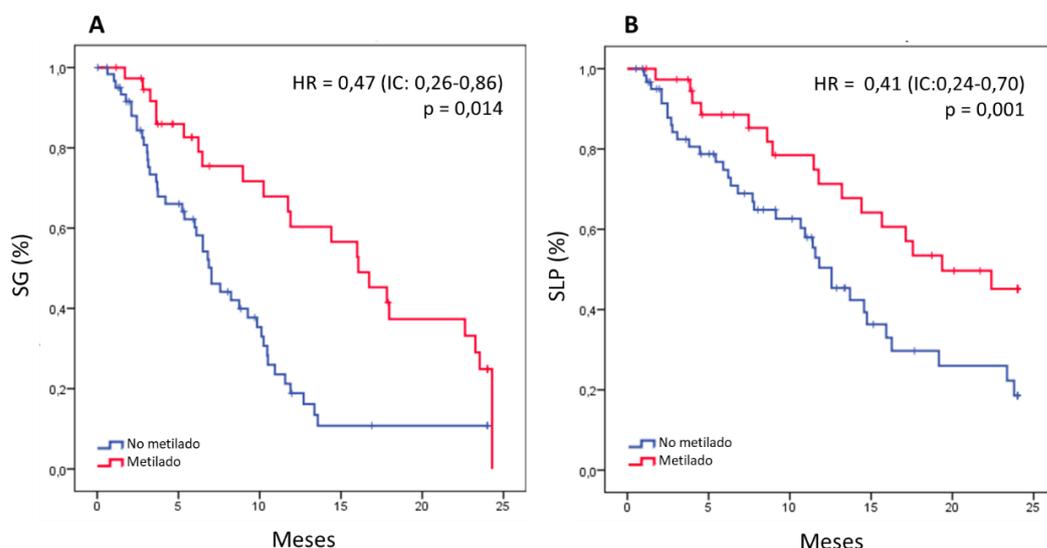


Figura 37. Análisis de supervivencia de nuestra cohorte de pacientes. **A.** Curva Kaplan-Meier de SG en función de la metilación de *MGMT* evaluada por qMSP. **B.** Curva Kaplan-Meier de SLP en función de la metilación de *MGMT* evaluada por qMSP.

Comparación de los métodos qMSP y MSP para la evaluación de la progresión según ROC (t)

Para abordar la capacidad del biomarcador *MGMT* para distinguir entre pacientes que responden al tratamiento y pacientes que no responden a lo largo del tiempo, realizamos curvas ROC(t) comparando ambas técnicas (MSP y qMSP). El área bajo la curva dependiente del tiempo

o AUC(t) para la SG fue de 0,49 cuando analizamos a los pacientes con el método de MSP y 0,60 con qMSP ($p=0,001$). El AUC(t) para la SLP fue de 0,50 cuando analizamos los pacientes con el método MSP y 0,58 con el método de qMSP ($p=0,032$). Estos datos indicarían que en tiempos inferiores a 5 meses la qMSP separaría mejor a los pacientes que la MSP (**Figura 38**).

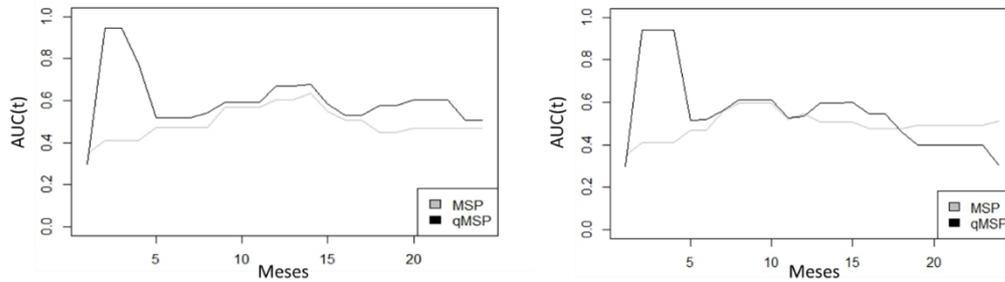


Figura 38. Curvas ROC(t) que predicen la SG y la SLP. **A:** AUC(t) para la SG ($p=0,001$). **B:** AUC(t) para la SLP ($p=0,037$)

2. Estudio de la metilación de *MGMT* en ADNlc

Con el objetivo de estudiar la sensibilidad y especificidad de la técnica qMSP para identificar la metilación de la región promotora del gen *MGMT* en biopsia líquida, procedimos a la comparación de los datos obtenidos en muestras pareadas de tejido y ADNlc. Desde febrero de 2016 a abril de 2018 se recogieron 21 muestras de sangre. Las muestras de sangre fueron obtenidas después de la cirugía y antes del tratamiento con quimio-radioterapia.

Debido a la dificultad que supone el manejo de las muestras con ADNlc por su baja cantidad y en base a los resultados obtenidos en el proceso de validación en el objetivo previo, las muestras de ADNlc sólo se procesaron por la técnica qMSP. Los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 8**:

ID	% Met <i>MGMT</i> en ADNlc	% Met tumor	Tipo de cirugía
33	0,0	0,0	Resección completa
37	0,0	0,0	Biopsia
38	0,0	91,5	Biopsia
40	0,0	0,0	Biopsia
44	0,0	0,0	Resección incompleta
45	1,5	77,0	Biopsia
48	0,0	92,6	Resección completa
49	0,0	100,0	Resección incompleta
50	0,0	0,0	Resección completa
52	0,0	99,9	Biopsia
53	0,0	0,0	Resección completa
58	0,0	0,0	Resección incompleta
60	0,0	0,0	Resección incompleta
61	0,0	0,0	Resección incompleta
62	0,0	0,0	Resección completa
66	0,0	0,0	Resección completa
69	0,0	0,0	Biopsia
70	0,0	0,4	Resección completa
101	0,0	0,0	Resección incompleta
124	13,3	73,2	Biopsia

Tabla 8. Resultados obtenidos para las muestras de ADNlc y su muestra pareada en tejido. %Met: Porcentaje de metilación calculado con qMSP.

En nuestra cohorte para el estudio de biopsia líquida basada en ADNlc, 6 pacientes presentaron *MGMT* metilado en el tumor mientras que sólo detectamos metilación en ADNlc en 2 de ellos.

El punto de corte empleado para definir presencia de metilación de forma cualitativa en tejido fue el establecido en el apartado previo (3,75%), mientras que para ADNlc se emplearon dos puntos de corte: el establecido para el tejido y también cualquier valor de metilación detectado (>0%) atendiendo a que desconocíamos de partida el valor esperado en ADN tumoral circulante que se estima <10% en pacientes con GB (105).

Cuando se empleó el punto de corte de 3,75% para el ADNlc, la concordancia fue del 66,7% (45,4-82,8). La sensibilidad para este punto de corte fue del 12,5% (IC: 2,2- 47,1), lo que supone un 87,5% de falsos negativos. La especificidad fue del 100% (IC: 77,2- 100). El VPP fue 100% (IC: 20,6-100) y el VPN fue de 65% (IC: 43,3-81,9). Cuando se calculó la concordancia de acuerdo al índice kappa no se encontró concordancia entre los resultados obtenidos en ADNlc y los resultados obtenidos en tejido ($p>0,05$).

Para el punto de corte de >0% para el ADNlc, los resultados fueron ligeramente mejores. La concordancia fue de 71,4% (50,0-86,2), con una sensibilidad del 25% (IC: 7,2- 59,1). La especificidad fue del 100% (IC: 77,2- 100). El VPP fue 100% (IC: 34,2-100) y el VPN fue de 68,4% (IC: 46,0-84,6). Con este punto de corte, el índice kappa tampoco reportó concordancia ($p>0,05$) por lo que se decidió no ampliar el número de muestras y realizar otro abordaje a través del uso del exoADN.

3. Estudio de la metilación de *MGMT* en exoADN

Con el objetivo de estudiar la sensibilidad y especificidad de la técnica qMSP para identificar la metilación de la región promotora del gen *MGMT* en exoADN, desde diciembre de 2016 a enero de 2021 se recogieron 53 muestras de sangre. Las muestras de sangre fueron obtenidas después de la cirugía y antes del tratamiento con quimio-radioterapia.

3.1. Caracterización de los exosomas

- Análisis por rastreo de nanopartículas

Para definir el número total de VE y su distribución de tamaño en las muestras, se diluyeron 16 muestras 1:100 en PBS y se inyectaron en el NanoSight LM10. Se puede observar una imagen representativa de su visualización en la **Figura 39**:

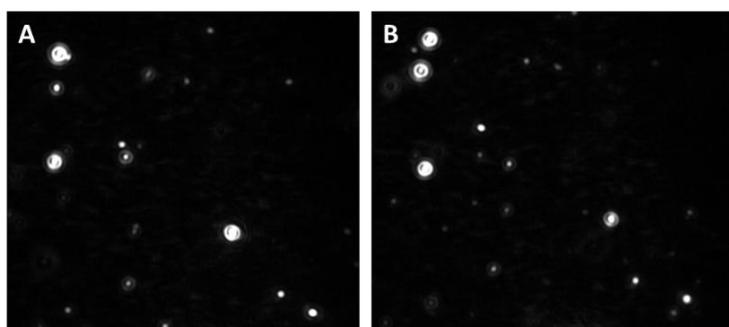


Figura 39. Imagen representativa de las nanopartículas capturadas con el microscopio del Nanosight. **A y B** es la misma muestra capturada con un segundo de diferencia. Se aprecia que la intensidad de las nanopartículas ha variado entre ambas imágenes debido a su movimiento browniano.

Se muestra a continuación la concentración obtenida para las distintas muestras analizadas, así como su tamaño (**Tabla 9**).

ID	% Met Tumor	Tipo de resección	Restos	concentración VE (partículas/ml)	Media (nm)	Moda (nm)
58	0	incompleta	Restos	6.68×10^8	174,3	118,7
90	94,4	incompleta	Restos	1.03×10^9	173,4	137,2
106	0	incompleta	Sin restos	3.96×10^9	151	129,6
107	0	completa	Restos	2.51×10^9	158,3	120,9
108	81,19	incompleta	Posibles restos	2.49×10^9	129,2	101,7
109	0	completa	Restos	4.62×10^8	183,3	121,5
110	0	incompleta	Restos	2.77×10^9	179,7	138,6
111	0	completa	ND	4.67×10^9	179	155,4
112	99,45	completa	Restos	4.37×10^8	164	114,9
113	0	incompleta	Posibles restos	1.93×10^9	134	108,9
115	no tumor	biopsia	Posibles restos	1.58×10^9	167,5	106
116	11,79	completa	ND	1.53×10^9	165,1	118,1
117	85,84	completa	Posibles restos	3.52×10^8	164,1	147,4
118	37,42	completa	Posibles restos	9.69×10^8	146,5	103,9
119	no tumor	no cirugía	Restos	2.27×10^9	174,1	129,2
120	no tumor	biopsia	Restos	2.31×10^9	187	160,5

Tabla 9. Resultados de NTA obtenidos para las 16 muestras evaluadas.

El valor con mayor frecuencia (moda) en la distribución de tamaño de las VE fue de 121,2 nm (rango intercuartílico: 110,4-138,2) de diámetro medio, con una concentración media de las muestras fue de $1,8 \times 10^9$ (rango intercuartílico: $0,7-2,5 \times 10^9$) partículas por mililitro. Se muestran a continuación en la **Figura 40** el análisis de 4 de las muestras.

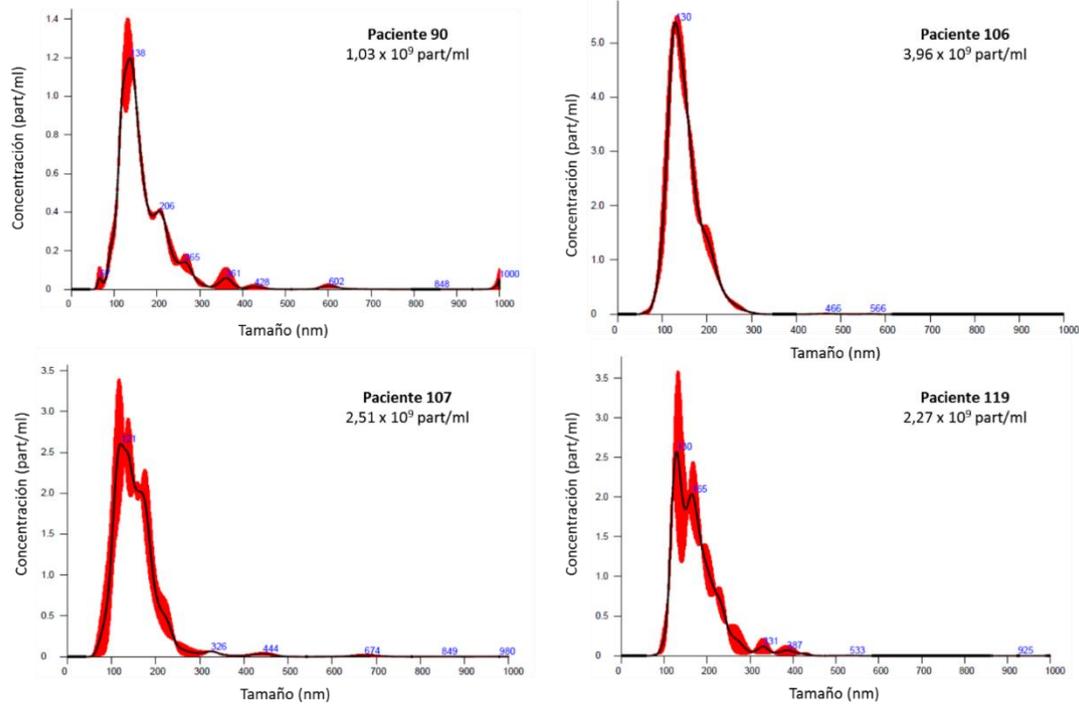


Figura 40. Perfiles de distribución del tamaño de las vesículas de 4 de nuestras muestras obtenidos mediante NTA.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de nanopartículas analizadas con NTA entre los pacientes que presentaron resección completa, incompleta o parcial (**Figura 41**).

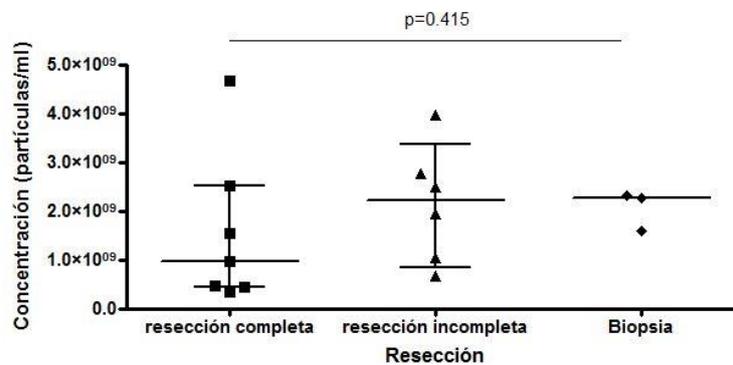


Figura 41. Concentración de VE según el tipo de resección. No existen diferencias significativas entre los distintos grupos analizados.

Cuando se evaluó la concentración de partículas según los resultados obtenidos en la RM postquirúrgica agrupándolos según la presencia de restos tumorales o restos dudosos y sin restos, tampoco se observaron diferencias significativas en la concentración de exosomas entre los distintos grupos (**Figura 42**). Sin embargo, sí que existe una ligera tendencia hacia valores más altos de concentración de exosomas en el grupo de pacientes en los que la RM postquirúrgica se asoció con la existencia de restos tumorales en la imagen.

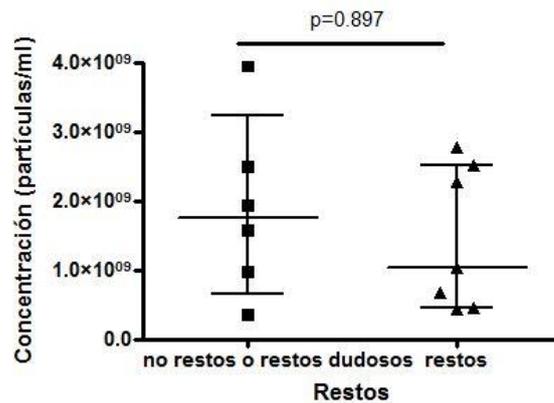


Figura 42. Concentración de VE según el resultado de la RM postquirúrgica. No existen diferencias significativas entre los distintos grupos analizados.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la concentración de exosomas y la presencia de metilación en el tumor (**Figura 43**).

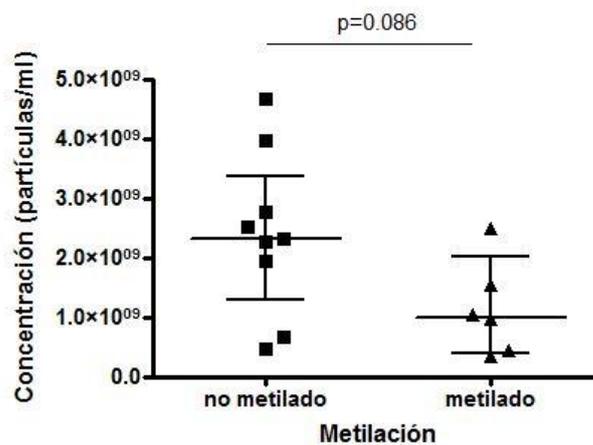


Figura 43. Concentración de VE según la metilación de MGMT en el tumor. No existen diferencias significativas entre los distintos grupos analizados.

- Microscopía electrónica de transmisión

En la mayoría de las VE observadas por MET el tamaño aproximado obtenido fue de 120 nm (**Figura 44**), confirmando los resultados obtenidos en el apartado anterior. Si bien, en la mayoría de los casos se observaron vesículas de tamaño inferior a 200 nm también se aislaron de manera minoritaria vesículas de mayor tamaño (entre 200 y 500 nm). En todos los casos se pudo apreciar la forma de copa característica que toman los exosomas al ser observados por MET.

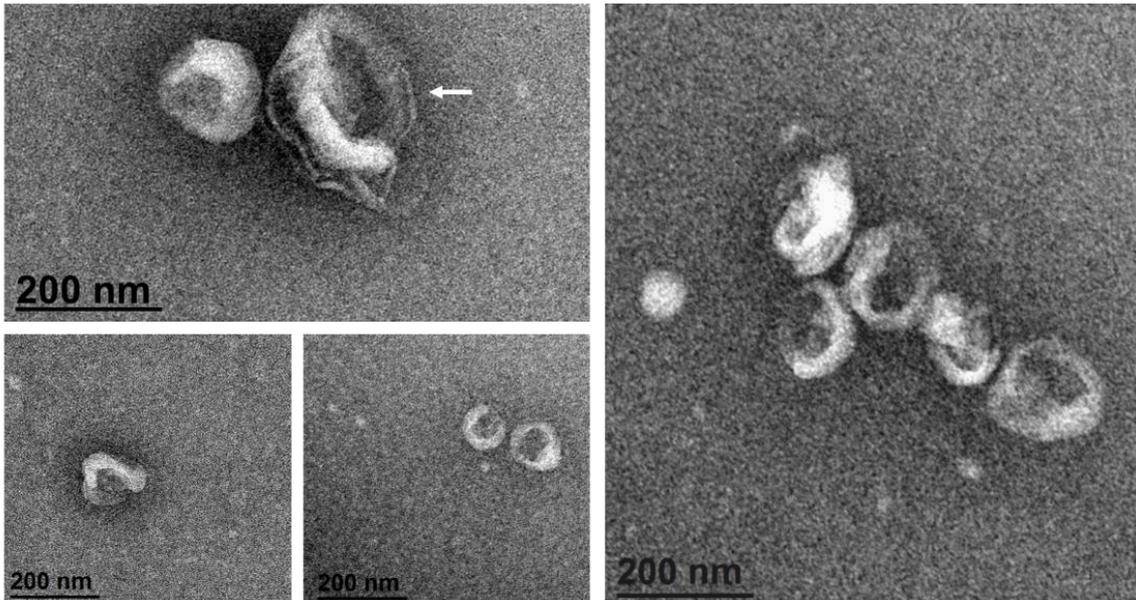


Figura 44. Las imágenes de MET muestran pequeñas vesículas de aproximadamente 120-130 nm de diámetro, en algunos casos agrupadas. La flecha indica una vesícula de mayor tamaño (>200 nm).

3.2. Metilación de la región promotora del gen *MGMT* en exoADN: plasma *versus* suero

Debido a la falta de estandarización asociada a las variables preanalíticas en el empleo del exoADN, se analizó la metilación de *MGMT* en exoADN en muestra de sangre de 8 pacientes recogidas en tubo de suero de manera pareada al tubo del EDTA con el objetivo de evaluar el efecto que pueda tener en los resultados de metilación en exoADN el efecto del tubo en el que se obtiene la muestra.

Los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 10**:

ID	% Met <i>MGMT</i> exoADN suero	% Met <i>MGMT</i> exoADN plasma	% Met Tumor	Tipo de cirugía
87	0,0	0,0	0,0	Biopsia
88	0,0	0,0	0,0	Resección completa
91	0,0	99,2	12,6	Biopsia
96	0,0	92,8	91,3	Resección incompleta
98	7,4	83,6	47,9	Resección incompleta
103	0,0	40,6	47,4	Resección completa
121	0,0	96,9	ND	Resección incompleta
123	0,0	87,4	100,0	Resección completa

Tabla 10. Datos de metilación en exoADN en suero y plasma.

De los 8 pacientes analizados, 5 presentaban metilación de *MGMT* en el tumor que fue también detectada en exoADN procedente de plasma. Sin embargo, esta metilación solo fue detectada en el paciente 98 cuando el exoADN fue aislado del tubo de suero. En este paciente el valor de metilación detectado en suero fue bastante inferior a lo obtenido en plasma, obteniendo 7,4% de metilación en la muestra de suero respecto a 83,6% en la muestra procedente de plasma.

Además, en el paciente 121 del que no se disponía muestra de tejido, se detectó metilación en exoADN en plasma mientras que ésta no fue detectada cuando la muestra de partida fue ADN libre de origen sérico.

3.3. Metilación de la región promotora del gen *MGMT* en exoADN procedente de plasma de pacientes con glioblastoma

En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior, para la realización del estudio de metilación en exoADN se partió de sangre obtenida en tubo de EDTA en 53 pacientes. Al igual que en el caso de ADNlc, las muestras de exoADN sólo se procesaron por la técnica qMSP.

Las muestras de sangre fueron obtenidas después de la cirugía y antes del tratamiento con quimio-radioterapia. Fue posible obtener muestra pareada de tejido en 47 de los 53 pacientes.

A continuación, se muestran en la **Tabla 11** los resultados de metilación obtenidos para las 47 muestras en las que se disponía del resultado de la metilación de *MGMT* en exoADN y en su tejido pareado.

ID	% Met <i>MGMT</i> en exoADN	% Met tumor	Tipo de cirugía	RMN postQx
45	100,0	77,0	Biopsia	Restos
48	90,6	92,6	Resección completa	Restos
50	0,0	0,0	Resección completa	Posibles restos
52	88,0	99,9	Biopsia	Restos
53	0,0	0,0	Resección completa	Posibles restos
56	0,0	0,0	Resección completa	Sin restos
58	0,0	0,0	Resección incompleta	Restos
60	0,0	0,0	Resección incompleta	Restos
61	0,0	0,0	Resección incompleta	Posibles restos
62	0,0	0,0	Resección completa	Restos
63	76,5	100,0	Resección completa	Posibles restos
65	0,0	100,0	Resección completa	Sin restos
66	0,0	0,0	Resección completa	Posibles restos
69	88,4	0,0	Biopsia	Restos
70	0,0	0,4	Resección completa	ND
74	0,0	0,0	Resección completa	ND
79	0,0	0,0	Resección completa	Sin restos
80	0,0	0,0	Resección incompleta	Restos
81	0,0	0,0	Resección completa	Sin restos
82	0,0	100,0	Resección completa	Restos
83	0,0	48,6	Resección completa	Sin restos
84	0,0	0,0	Resección completa	Posibles restos
85	0,0	0,0	Resección completa	Posibles restos
86	0,0	0,0	Resección incompleta	Posibles restos
87	0,0	0,0	Biopsia	Restos
88	0,0	0,0	Resección completa	Sin restos
90	0,0	94,4	Resección incompleta	Restos
91	99,2	12,6	Biopsia	Restos
93	0,0	0,0	Resección completa	Sin restos
96	92,9	91,3	Resección incompleta	Sin restos
98	83,6	47,9	Resección incompleta	Posibles restos
101	0,0	0,0	Resección incompleta	Sin restos
102	0,0	0,0	Resección incompleta	Posibles restos
103	40,6	47,4	Resección completa	Posibles restos
104	0,0	0,0	Resección incompleta	Restos
105	0,0	0,0	Resección incompleta	Restos
106	0,0	0,0	Resección completa	Sin restos
107	95,0	81,2	Resección incompleta	Restos
108	0,0	0,0	Resección completa	Posibles restos
109	0,0	0,0	Resección incompleta	Restos
110	0,0	0,0	Resección completa	Restos
112	0,0	0,0	Resección incompleta	Restos
115	0,0	11,8	Resección completa	Posibles restos
116	0,0	85,8	Resección completa	ND
117	0,0	37,4	Resección completa	Posibles restos
123	87,4	100,0	Resección completa	Posibles restos
125	7,6	100,0	Resección completa	Sin restos

Tabla 11. Resultados de metilación de *MGMT* en exoADN y en su tumor pareado. ND: resultado no disponible.

Teniendo en cuenta los valores elevados de metilación en exoADN, el punto de corte para definir metilación fue el establecido para el tumor . En 18 de los pacientes se detectó metilación del promotor de *MGMT* en el tejido tumoral mientras que la metilación en exoADN fue detectada en 11 de estos pacientes. De los 7 casos en los que no fue detectada la metilación en

exoADN, 6 de ellos correspondían a resección completa. De estos 6 pacientes, 2 habían presentado en la RM postquirúrgica ausencia de restos tumorales, mientras que en 2 de ellos la presencia de restos era dudosa, en uno de ellos se apreciaban restos tumorales y en el último paciente los datos de la RM no estaban disponibles. En un paciente se detectó metilación en exoADN mientras que en la muestra de tejido no fue detectada (paciente 69). Por lo tanto, la sensibilidad para detectar metilación en exoADN respecto a la metilación encontrado en tejido fue del 61,1% (IC: 38,6-79,7) mientras que la especificidad fue del 96,6% (82,8-99,4). El VPP y el VPN fueron de 91,7% (IC: 64,6-98,5) y 80,0% (IC: 64,2-89,9). El índice kappa mostró buena concordancia ($k=0,616$) entre el tejido y el exoADN ($p<0,001$) y el porcentaje de concordancia obtenido entre las muestras de exoADN y las de tejido fue del 82,9% (IC: 69,9-91,1).

Como podríamos esperar, si sólo tenemos en cuenta los pacientes que fueron sometidos a resección incompleta o biopsia, 7 presentaron metilación en el tumor y de ellos, en 6 fue posible la detección de la metilación en exoADN. En este caso la sensibilidad sería del 85,7% (IC: 48,7-97,4) y la especificidad sería del 92,4% (IC: 66,7-98,6), con un VPP de 85,7% (IC: 48,7-97,4) y un VPN de 92,4% (IC: 66,7-98,6). Presentando un índice kappa de 0,780 y una concordancia del 90% (IC: 69,9-97,2).

En 6 de los pacientes (12%) no se pudo obtener muestra de tejido pareada para la comparación de los resultados. En un paciente el diagnóstico fue exclusivamente radiológico y no se realizó toma de muestra. En 4 de los pacientes sólo pudo realizarse biopsia, no habiendo células tumorales en el material biopsiado (**Figura 45**) o no quedando muestra disponible para la determinación del estado de metilación de *MGMT*. En un paciente, a pesar de tener resección incompleta, la muestra presentó abundante necrosis, no habiendo cantidad suficiente de células tumorales para la realización de *MGMT* (**Figura 45**).

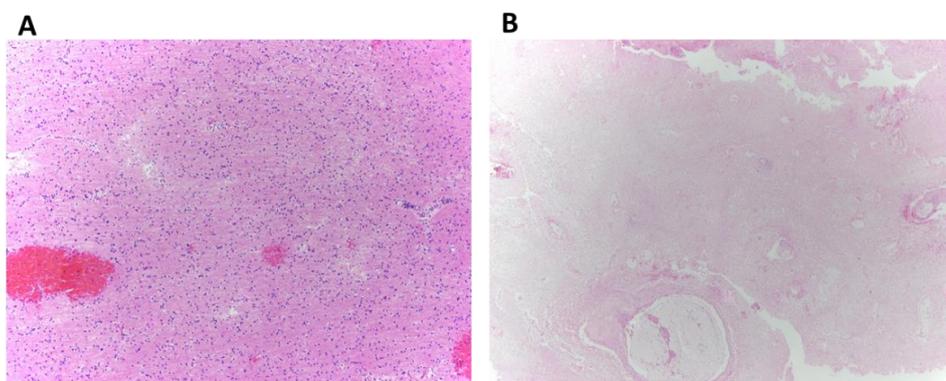


Figura 45: A. Zona de tejido cerebral normal (sustancia blanca) sin evidencia de afectación tumoral. B. Necrosis

Los resultados de metilación en exoADN de los 6 pacientes en los que no se disponía de tumor se muestran en la **Tabla 12**.

ID	% Met <i>MGMT</i> exoADN	Tipo de cirugía	Comentarios
114	0,0	Biopsia	SLP 2,7
118	97,6	No cirugía	no candidato a tratamiento
119	0,0	Biopsia	en seguimiento (2 meses)
120	0,0	Biopsia	SLP 1,8
121	96,9	Resección incompleta	SLP 11,1
122	0,0	Biopsia	perdido

Tabla 12. Datos de metilación en exoADN y datos clínicos de los 6 pacientes de los que no se disponía tejido.

En dos de los 6 pacientes de los que no se disponía tumor se detectó metilación en sangre (118 y 121). En el paciente 118 no se realizó cirugía y tampoco fue candidato a tratamiento. El paciente 121 presentó una SLP de 11,1 meses, mucho mayor que la esperada para los pacientes biopsiados, como puede ser el caso de los pacientes 114 y 120, con supervivencias de 2,7 y 1,8 meses, respectivamente.

Del total de las muestras analizadas en exoADN, 13 fueron pareadas a las muestras de ADNlc. De las 13 muestras, 3 presentaron metilación en *MGMT* que fue detectada en exoADN mientras que sólo se detectó en 1 de las muestras de ADNlc, sugiriendo que las muestras procedentes de plasma proporcionan mejores resultados.

3.4. Metilación de la región promotora de *MGMT* en exoADN procedente de plasma de pacientes sanos

En base a los buenos resultados obtenidos en exoADN, el siguiente paso fue confirmar que en individuos sanos no se detecta metilación de *MGMT* en el contenido exosomal, como sería de esperar para *MGMT* al tratarse de un gen reparador. Realizamos por tanto el análisis de la metilación en exoADN procedente de 9 pacientes sanos, no detectándose metilación en ninguno de ellos (**Tabla 13**).

ID	% Met <i>MGMT</i> exoADN
C1	0,0
C2	0,0
C3	0,0
C4	0,0
C5	0,0
C6	0,0
C7	0,0
C8	0,0
C9	0,0

Tabla 13. Datos de metilación en exoADN procedente de plasma de controles.

4. *MGMT* en exoADN como herramienta de monitorización en pacientes con glioblastoma

En el tiempo de desarrollo de este trabajo fue posible obtener muestras de sangre de seguimiento de 10 pacientes a lo largo del tratamiento. De un paciente se consiguieron obtener tres muestras de seguimiento, además de la muestra previa al tratamiento. De dos pacientes se obtuvieron dos muestras. Del resto de pacientes solo fue posible obtener una muestra de seguimiento. De uno de los pacientes no fue posible obtener la muestra previa al tratamiento, pero se obtuvieron dos muestras de seguimiento. Los datos de metilación de *MGMT* en todas las muestras de sangre obtenida se muestran en la **Tabla 14**.

ID	% Met <i>MGMT</i> ExoADN Basal	% Met <i>MGMT</i> ExoADN Sg1	% Met <i>MGMT</i> ExoADN Sg2	% Met <i>MGMT</i> ExoADN Sg3	% Met <i>MGMT</i> Tumor	RM postqx	Tipo de cirugía	Progresión RANO	SLP/ Seguimiento
45	100,0	91,3	0,0	0,0	77	Restos	Biopsia	no	39,1
48	90,6	99,9	88,0	ND	92,6	Restos	Resección completa	si	9,0
58	0,0	0,0	ND	ND	0	Restos	Resección incompleta	si	41,9
65	0,0	0,0	0,0	ND	100,0	Sin restos	Resección completa	no	17,9
90	0,0	0,0	ND	ND	94,4	Restos	Resección incompleta	no	21,4
98	83,6	99,3	ND	ND	47,9	Posibles restos	Resección incompleta	si	10,4
103	40,6	0,0	ND	ND	47,4	Posibles restos	Resección completa	si	6,1
109	0,0	0,0	ND	ND	0,0	Restos	Resección incompleta	si	3,3
121	96,9	0,0	ND	ND	ND	Restos	Resección incompleta	si	11,1
123	ND	87,4	0,0	ND	100,0	Posibles restos	Resección completa	no	12,0

Tabla 14. Datos de metilación en exoADN en la muestra basal y en sucesivas muestras de seguimiento. Sg: seguimiento. ND: resultado de *MGMT* no disponible. RANO: Criterios clínico-radiológicos de respuesta RANO.

Podemos observar que se dan cuatro escenarios distintos:

- A: Pacientes con presencia de metilación en tumor que también es detectada en exoADN la muestra basal y/o en la primera muestra de seguimiento y que en muestras posteriores se pierde la metilación (pacientes 45, 103, 121, 123).
- B: Pacientes con presencia de metilación en tumor que también es detectada en exoADN en todas las muestras de sangre obtenidas en el seguimiento (pacientes 48, 98).
- C: Pacientes con presencia de metilación en tumor que no se ha detectado en exoADN en ninguna de las muestras de sangre (pacientes 65, 90).

- D: Pacientes con ausencia de metilación en tumor y que presentan ausencia de metilación en exoADN en todas las muestras de sangre obtenidas durante el seguimiento (pacientes 58 y 109)

Se detalla a continuación la historia de los pacientes en los que ha sido posible obtener más muestras junto con la evolución observada en exoADN.

El paciente 45, de 25 años, presentó en el año 2000 un Linfoma Burkitt cerebral estadio IV con recaída abdominal en 2001. Fue tratado con quimiorradioterapia y trasplante alogénico. En la RM de control de diciembre de 2016 se observaron hallazgos sugestivos de tumoración glial de alto grado. El diagnóstico anatómopatológico reveló un GB IDH no mutado, *MGMT* metilado. No fue posible la realización de cirugía citoreductora, obteniéndose la muestra para el diagnóstico anatómopatológico mediante biopsia (**Figura 46**).

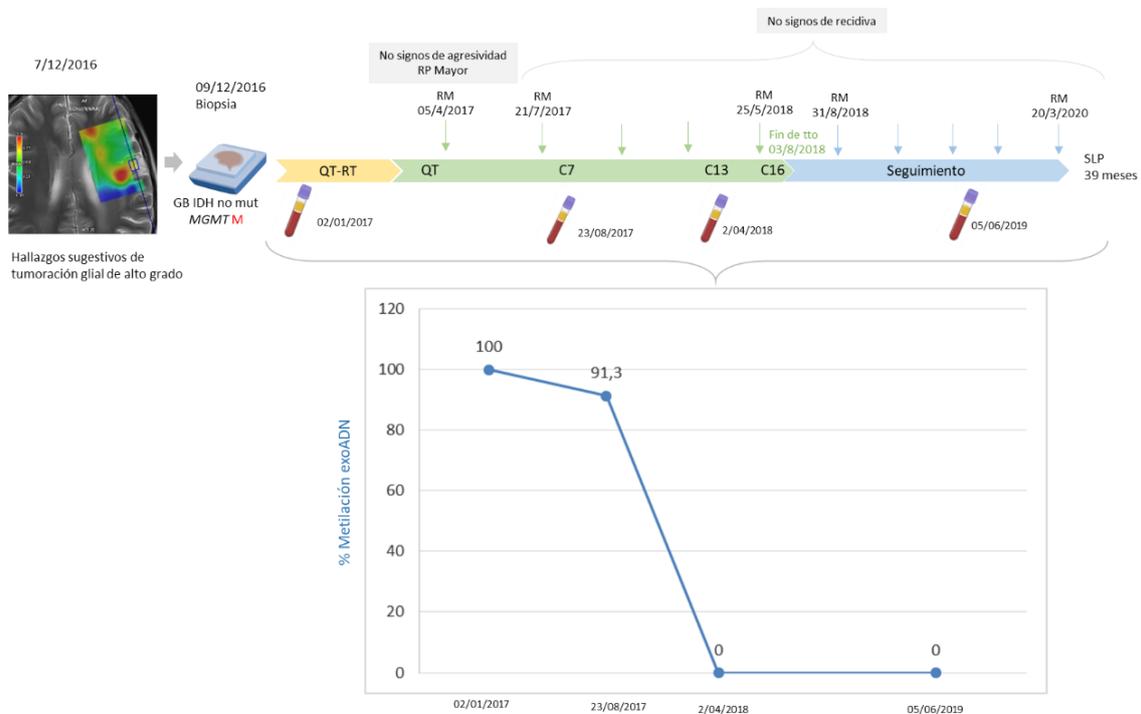


Figura 46. Esquema de la evolución clínica y de los resultados de metilación de *MGMT* obtenidos exoADN del paciente 45.

Como se puede observar en la figura, los niveles de metilación en exoADN disminuyeron a lo largo del tratamiento, observándose una disminución a los 8 meses de iniciado el tratamiento y siendo indetectables 8 meses después. Estos datos concuerdan con los obtenidos en las pruebas de imágenes en los que el paciente obtuvo una espectacular respuesta radiológica con RP mayor a los 4 meses de iniciado el tratamiento y no mostrando signos de recidiva en las RM posteriores.

El paciente lleva 39 meses libre de enfermedad y actualmente desarrolla una vida normal, resultados increíbles a pesar del mal pronóstico de esta patología.

Los casos 121 y 123 están el mismo escenario, si bien el paciente 121 presentó una SLP de 11,1 meses mientras que el paciente 123 lleva actualmente 12 meses de seguimiento y está libre de progresión. En el caso del paciente 103, a pesar de presentar en la segunda muestra de seguimiento un resultado negativo, presentó una SLP menor.

La paciente 48 fue derivada a urgencias por cuadro de desorientación. La RM mostró una imagen sugestiva de tumor cerebral. El tumor fue operado en enero de 2017 con resección macroscópicamente completa del tumor en enero de 2017 con diagnóstico de GB IDH no mutado, *MGMT* metilado. La paciente inició esquema STUPP un mes después. Se obtuvo una muestra de sangre al inicio del tratamiento y otras dos muestras más a lo largo de su enfermedad. A pesar de haber tenido una resección macroscópicamente completa, la RM postquirúrgica reveló presencia de restos tumorales. Se detectaron niveles de metilación de *MGMT* en exoADN en la muestra previa al tratamiento que aumentaron en la muestra obtenida 7 meses después. La paciente progresó en noviembre del 2017, siendo candidata a rescate quirúrgico e iniciando tratamiento con fotemustina. Los niveles de metilación en exoADN continuaron siendo detectables durante el tratamiento con fotemustina sin observarse un descenso de los mismos, indicando la persistencia de presencia de ADN tumoral en el contenido exosomal. La paciente falleció en agosto de 2018. Su evolución clínica y sus niveles de *MGMT* en exoADN se muestran en la **Figura 47**. Un curso clínico parecido es el presentado por la paciente 98.

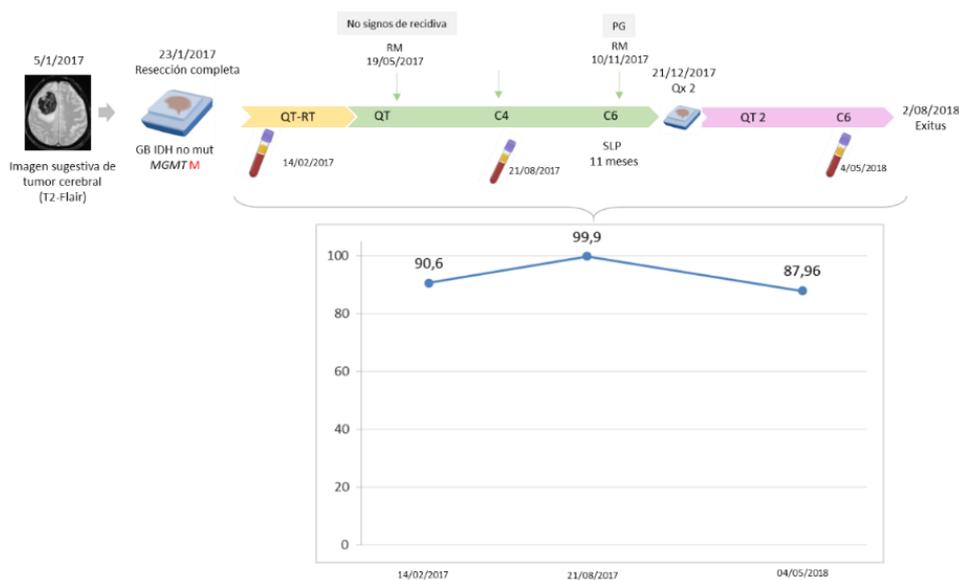


Figura 47. Esquema de la evolución clínica y de los resultados de metilación de *MGMT* obtenidos exoADN del paciente 48.

La paciente 65 se trataba de una mujer de 69 años que es estudiada en otro hospital por alteración del comportamiento. La RM mostró lesión infiltrante del parénquima cerebral con signos de importante agresividad por lo que fue intervenida en diciembre de 2017 con resección macroscópicamente completa de la lesión, objetivándose un GB IDH no mutado, *MGMT* metilado. Fue posteriormente derivada a nuestro hospital para tratamiento con esquema STUPP. Se extrajeron muestras de sangre al inicio y a lo largo del tratamiento no observándose metilación en exoADN a pesar de mostrar un tumor *MGMT* metilado. La paciente completa 12 meses de TMZ en monoterapia sin mostrar signos de recidiva en ninguna de las RM realizadas en los 39 meses posteriores. La paciente fallece por causa desconocida unos meses después de finalizado el tratamiento. La evolución de la paciente y sus niveles de exoADN se muestran en la

Figura 48.

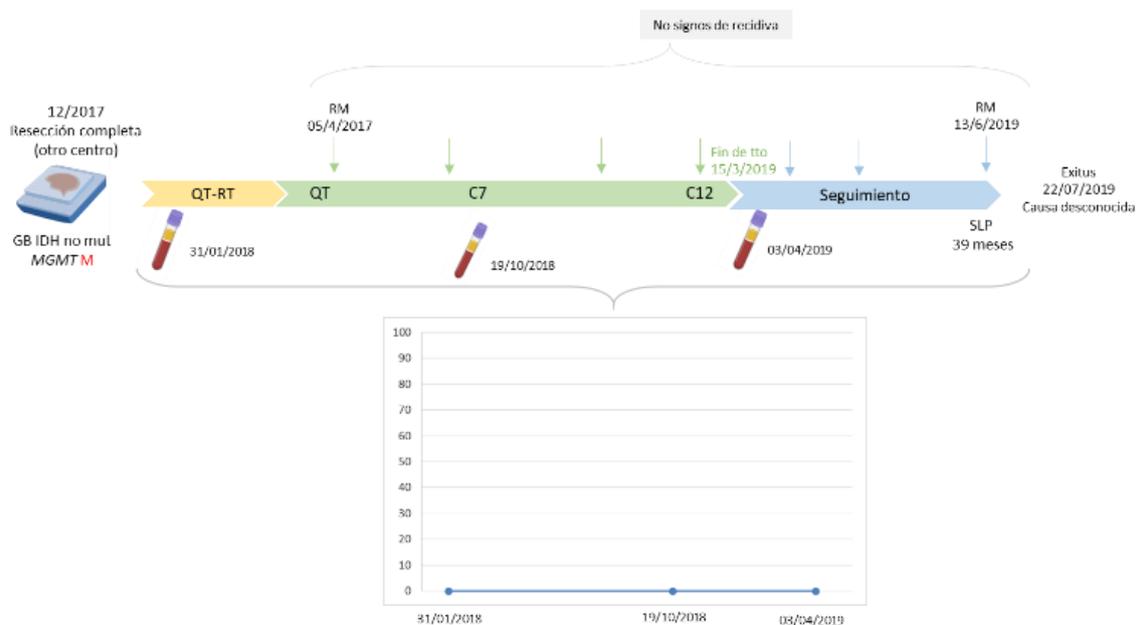


Figura 48. Esquema de la evolución clínica y de los resultados de metilación de *MGMT* obtenidos exoADN del paciente 65.

De forma similar ocurre en el paciente 90, en el que no se detecta metilación en exoADN pero sí en tumor, llevando actualmente 21,4 meses sin presencia de recidiva.

Los pacientes que presentaron ausencia de metilación en tumor y en exoADN en todas las muestras de sangre recogidas presentaron un curso de la enfermedad totalmente diferente.

El paciente 109 presentó progresión de su enfermedad a los 3,3 meses de iniciar el tratamiento. Sin embargo, el paciente 58 ha presentado una SLP de 41,9 meses, datos que sugieren que

podría haber obtenido un resultado falso negativo en tumor puesto que su SLP es muy superior a la esperada. El paciente ha sido candidato a una segunda cirugía en la que ha mostrado presencia de metilación del gen *MGMT* en la nueva muestra, datos que avalan la hipótesis de que pudiera haber sido un falso negativo en la muestra de la primera cirugía.

Discusión

DISCUSIÓN

1. Validación de la nueva técnica qMSP para la detección de la metilación de *MGMT*

Los biomarcadores se están convirtiendo en herramientas básicas para la medicina de precisión. Los avances tecnológicos y científicos ya respaldan el uso clínico de la información genética para guiar la toma de decisiones en diversas patologías.

El glosario de la FDA de biomarcadores, criterios de valoración y otras herramientas denominado BEST (del inglés, *Biomarkers, EndpointS, and other Tools* o BEST) define un biomarcador como una característica concreta que se mide como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas a una exposición o intervención. El glosario BEST tiene como objetivo definir las diferencias entre los distintos biomarcadores y los resultados clínicos de los mismos y describir sus distintos roles en la investigación biomédica, la práctica clínica y el desarrollo de productos médicos (180).

En términos generales, según el BEST, los biomarcadores del cáncer se pueden dividir en tres categorías (180):

- **Diagnósticos:** Los biomarcadores se utilizan para detectar e identificar un tipo determinado de cáncer en un individuo. Se espera que este tipo de biomarcadores tenga niveles elevados de sensibilidad y especificidad.

- **Pronósticos:** se utilizan una vez que el estado de la enfermedad ha sido establecido. Se espera que predigan el curso probable de la enfermedad.

- **Predictivos:** son biomarcadores de estratificación y sirven para predecir la respuesta probable a un fármaco antes de iniciar el tratamiento, clasificando a los individuos como "respondedores" o "no respondedores". El biomarcador *MGMT* se enmarcaría por lo tanto dentro de este grupo.

En el caso de los biomarcadores, es fundamental establecer que la prueba empleada para la detección del biomarcador mide lo que se pretende medir (validación analítica) y que el biomarcador tiene la capacidad de predecir o valorar el concepto clínico de interés (validación clínica). Por lo tanto, la validación es el elemento crucial para garantizar que un biomarcador es adecuado para el uso propuesto.

1.1. Validación analítica

En primer lugar, se diseñó la sonda de hidrólisis para la PCR cuantitativa basándonos en los estudios previos publicados sobre las CpG más relevantes que impactan en el silenciamiento del gen *MGMT*. La sonda de hidrólisis o sonda TaqMan® está formada por un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de un oligonucleótido que hibrida con la secuencia de interés y un desactivador de fluorescencia en el extremo 3'.

Para elegir la mejor posición CpG de hibridación de la sonda se tuvieron en cuenta las publicaciones anteriores que demostraron que la metilación de las posiciones CpG 83, 86, 87 y 89 y las posiciones CpG 73, 75, 79 y 80 son críticas para la regulación transcripcional de *MGMT* (82, 83) así como la CpG 84, posición descrita por Bady *et al.* como una de las dos posiciones que más impactan en la supervivencia (84).

Los cebadores que se utilizan habitualmente para la técnica clásica MSP son los publicados por Esteller *et al.*, y presentan en el cebador reverso las CpG 84, 86 y 87 y en el cebador directo las posiciones CpG 75, 79 y 80 (43). Teniendo en cuenta todo ello, se diseñó la técnica qMSP empleando lo mismos cebadores descritos por Esteller *et al.* ya que abarcaban la mayoría de las CpG más relevantes y haciendo que las sondas de hidrólisis hibridasen en las posiciones en la CpG 82 y 83, ésta última también descrita como de las más importantes en el estudio de Malley *et al.* pero que no es tomada en cuenta en los cebadores clásicos.

Una vez diseñadas las sondas de hidrólisis, el siguiente paso fue comprobar que la determinación del biomarcador *MGMT* con la nueva técnica qMSP se asociaba a una disminución de la expresión transcripcional del gen. Para ello se estudió la metilación del gen en 5 líneas celulares y se observó que se relacionaba de manera inversa con la expresión. En aquellas líneas celulares en las que no se detectó metilación, el gen *MGMT* se expresaba de forma similar a lo que se expresa en cerebro normal mientras que en la línea celular en la que se detectó un 100% de metilación existía ausencia de expresión.

El siguiente paso de la validación analítica fue establecer las características que presentaba nuestra nueva técnica respecto a la técnica clásica en sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Se empleó una curva ROC para establecer el mejor punto de corte en la técnica cuantitativa respecto a la técnica clásica. El punto de corte con mejores características de sensibilidad y especificidad fue 3,75% de metilación, presentando un AUC de 0,962. Con este

punto de corte, la concordancia entre ambas técnicas fue del 92%, con una sensibilidad del 100%.

La concordancia del 92% se debe a que se detectaron 8 muestras metiladas por qMSP que no fueron identificadas por MSP, por lo que teniendo en cuenta que la MSP es la técnica empleada como referencia, estas 8 discrepancias deberían considerarse como falsos positivos, disminuyendo nuestra especificidad al 88,6 %. Sin embargo, a favor de nuestra metodología es importante incidir en que los ensayos con sondas de hidrólisis combinan la química de la PCR con la detección del producto con una sonda de fluorescencia que estabiliza la estructura de la doble hebra resultando en una mejora de la especificidad alélica (181). La fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de ADN de interés presente en el producto de PCR por lo que la PCR con sondas de Taqman® puede excluir la ambigüedad de interpretación que puede causar sesgos en la PCR clásica visualizada bajo luz ultravioleta. Por tanto, si tenemos en cuenta la mejora que ofrece el empleo de sondas de hidrólisis que aumenta en un orden de magnitud la sensibilidad pasando de 1:1.000 a 1:10.000 (182), cabe la posibilidad de que las ocho nuevas muestras identificadas como metiladas por qMSP pudieran ser falsos negativos de la técnica clásica. Apoyando esta hipótesis está el hecho de que en tres de cinco muestras en las que quedaba ADN se pudo confirmar la presencia de metilación por una técnica MSP alternativa (pacientes 1, 78 y 100). Además, dos de estos ocho pacientes presentaron una mediana de supervivencia de más de 20 meses, supervivencia esperada para los pacientes con presencia de metilación en el promotor de *MGMT* (pacientes 1 y 76), lo que avalaría la suposición de que pudieran ser falsos negativos de la MSP. Por su parte, los pacientes 28 y 78 presentaron una mediana de supervivencia de 8,3 meses con resección tumoral incompleta y 12,6 meses con resección completa, supervivencia estándar en esta patología, mientras que los pacientes 89 y 91 presentaron los peores datos de supervivencia, 4,5 meses y 4,8 meses, respectivamente, pero fueron pacientes no subsidiarios de cirugía y que ya presentaban un mal pronóstico de base. Los otros dos pacientes se trasladaron de hospital por lo que no tenemos datos de supervivencia disponibles para poder discutir su relación con el estado de metilación de *MGMT* (75 y 100).

Otra posible causa que explicaría esta discrepancia y el aumento de la sensibilidad en qMSP es que las posiciones donde se dirige la sonda (CpG 82 y 83) podrían estar metiladas en estos pacientes mientras que las CpG situadas en los cebadores podrían no estarlo. Esta situación aportaría un resultado positivo para qMSP que podría ser negativo en el caso de MSP ya que con la metodología clásica las posiciones CpG situadas en las regiones de la sonda no son consideradas.

A pesar de estas menores discrepancias, la concordancia con el índice kappa fue muy buena (0,823), pudiendo considerarse por tanto ambas técnicas como intercambiables ya que según la interpretación del índice kappa propuesta por Landis y Koch sugiere que un valor de índice kappa $>0,81$ da lugar a un grado de acuerdo casi perfecto entre ambas metodologías (178).

1.2. Validación clínica

Una vez demostrada la concordancia entre las dos pruebas, el siguiente paso fue la realización de la validación clínica, ya que es fundamental establecer que la prueba determina correctamente el resultado clínico esperado. Así, al tratarse *MGMT* de un biomarcador predictivo de respuesta a terapia, los criterios principales a valorar fueron la SLP y SG en función del estado de metilación de *MGMT*.

El principal factor de buen pronóstico para la supervivencia del GB es la presencia de la mutación de IDH, por lo que para evitar factores de confusión sólo se incluyeron en esta parte del estudio pacientes con GB portadores de IDH no mutado (3, 183).

En nuestra cohorte, sin hacer análisis de subgrupos, la SLP fue de 9,8 meses y la SG de 14,6 meses, datos similares a los publicados por Stupp *et al.*, en los que observaron una SLP de 6,9 meses y una SG de 14,6 meses (37).

La resección radical del tumor, una menor edad y un buen estado funcional han sido también descritos como factores pronósticos favorables (3). En nuestra cohorte de 100 pacientes, en el modelo univariante de SLP y SG observamos diferencias significativas en función del tipo de resección, obteniendo un pronóstico mucho más desfavorable aquellos pacientes en los que no fue posible realizar resección quirúrgica. Estos datos son similares a los reportados previamente (34). En los pacientes en los que fue posible la resección quirúrgica, las diferencias observadas entre los grupos de resección macroscópicamente completa o incompleta no fueron significativas, quizás por la dificultad que supone en este tipo de tumor la realización de la resección completa debido al carácter infiltrante del GB, hecho que hemos observado también en nuestra cohorte al analizar los datos de las RM posquirúrgica.

En nuestra cohorte no observamos diferencias en relación a la edad o al estado funcional. Respecto a la localización del tumor, nuestros datos son similares a los previamente publicados (184), y tampoco observamos diferencias en supervivencia según la localización anatómica del tumor. Al analizar si la presencia de metilación de *MGMT* se relacionaba con la edad, el ECOG o el tipo de cirugía, observamos que no existían diferencias entre grupos.

Teniendo en cuenta por tanto la existencia de factores pronósticos previamente descritos realizamos un modelo de COX multivariante incluyendo el tipo de resección, la edad, el sexo, el ECOG y el estado de metilación de *MGMT*. A pesar de los resultados previamente obtenidos para la variable denominada tipo de cirugía, el estado de metilación de *MGMT* (tanto en el modelo para MSP como en el modelo para qMSP) resultó ser el único factor que estadísticamente resultaba significativo en el modelo de COX, por lo que se construyó un modelo univariante para el estudio de la variable metilación y la supervivencia.

En el estudio de Hegi *et al.* obtuvieron que los pacientes con el promotor metilado presentaban una SG de 18,2 meses respecto a 12,2 meses en el grupo de los no metilados (45). En nuestro caso, la SG no fue alcanzada para el grupo de los metilados, pero si hubiéramos tenido seguimiento durante más meses se espera que fuese parecida a la obtenida en el estudio de Hegi *et al.*. En el grupo de pacientes con *MGMT* no metilado, tanto por MSP (mediana 11,8 meses) como para qMSP (mediana 12,6 meses) se obtuvieron datos comparables al estudio de Hegi *et al.* (45). Los datos reportados en el estudio de Hegi *et al.* para SLP también fueron parecidos a los obtenidos en nuestra cohorte, con una SLP de 10,3 meses para el grupo de pacientes con el promotor de *MGMT* metilado, siendo los resultados en nuestra cohorte ligeramente superiores tanto por MSP (18 meses) como por qMSP (16 meses). En el grupo no metilado, obtuvimos por ambas técnicas una SLP de 7 meses, también ligeramente superior a la reportada en el estudio previo de 5,3 meses. El análisis por Kaplan-Meier mostró, por lo tanto, que los pacientes con el promotor de *MGMT* metilado presentaban tanto la SG como la SLP significativamente más prolongadas que en pacientes no metilados, independientemente de usar MSP o qMSP. Por lo tanto, ambas técnicas permiten la clasificación de los pacientes como respondedores o no respondedores en términos de SLP y SG.

Cuando se analizó la supervivencia empleando curvas ROC dependientes del tiempo para comparar las técnicas MSP y qMSP, observamos que el AUC(t) para la SG y la SLP fue mayor cuando usamos el método de qMSP, 0,60 *versus* 0,49 para SG y 0,58 *versus* 0,50 en SLP, sugiriendo que la qMSP puede ser más eficiente para separar pacientes que presentan mayor SG y SLP de acuerdo con la metilación de *MGMT*, en tiempos de seguimiento cortos.

1.3. Estandarización

Debido a la ausencia de técnicas adecuadamente estandarizadas y validadas, la armonización internacional del biomarcador *MGMT* es aún una necesidad clínica no resuelta. Varios estudios reportan la pirosecuenciación como el método elegido para el análisis de la metilación del

promotor de *MGMT* en la práctica clínica habitual (87, 185, 186). La limitación actual de la pirosecuenciación es la ausencia de un consenso respecto a un límite establecido para la clasificación binaria y sobre cuáles son los sitios CpG más importantes de analizar en la práctica clínica ya que existen varios protocolos de pirosecuenciación que difieren en cuanto al número y la posición de los sitios CpG estudiados (88, 187).

En nuestro estudio, decidimos emplear la MSP como referencia porque fue el primer método descrito y es una técnica bien conocida que ha demostrado su valor predictivo en ensayos clínicos aleatorizados (47, 48, 188, 189). Sin embargo, la MSP no es un método automatizado, por lo que es difícil de estandarizar y en ocasiones puede llevar a cabo a interpretaciones subjetivas. Por el contrario, la qMSP aporta un porcentaje de metilación cuantitativo a través de una fórmula matemática por lo que no está sujeto a la interpretación individual de los resultados una vez definido el valor de corte, facilitando su estandarización y con una concordancia muy alta respecto la técnica clásica por lo que resulta una metodología alternativa a la MSP convencional.

2. ADNlc y exoADN como herramientas para la detección de *MGMT* en biopsia líquida

El manejo del cáncer está en continua evolución, por ello exige desafíos y demandas asociados con el diagnóstico, pronóstico y predicción de la resistencia a los tratamientos. El estado de metilación de *MGMT* es un factor predictivo bien conocido en pacientes con GB por lo que su evaluación es un factor importante para decidir la mejor estrategia de tratamiento o la selección de pacientes en ensayos clínicos. Por lo tanto, su abordaje a través de biopsia líquida resultaría muy valioso (116).

2.1. Plasma *versus* suero para la detección de la metilación de *MGMT* en exoADN

Es importante señalar que mientras se avanza en el campo de las VE, hay que poner atención en las discrepancias entre los diferentes estudios que impiden replicar biomarcadores en cohortes independientes. Estas discrepancias a menudo se deben a la variabilidad existente en las condiciones preanalíticas por lo que su estandarización se considera una parte crucial de los estudios con VE (190).

Dado que no existe ningún estudio sobre el efecto de los anticoagulantes en la detección de metilación en exoADN, decidimos por tanto evaluar el efecto que pueda ejercer en la detección

de la metilación de *MGMT* la extracción en tubo de suero respecto al plasma ya que es habitual encontrar el uso de este tipo de tubos en estudios con VE. Este efecto se evaluó en 8 muestras, manteniendo estables el resto de las características preanalíticas entre ambas muestras (tiempo de recogida, el procesamiento y almacenamiento). De todos los pacientes, 5 de ellos presentaba metilación en exoADN procedente de plasma, mientras que la metilación sólo fue detectada en el paciente 98 en exoADN en suero. El paciente 98 presentó un porcentaje de metilación en exoADN de suero de 7,4% mientras que la metilación en exoADN de plasma para este mismo paciente fue de 83,6%. Estos datos sugieren que la sensibilidad para detectar la metilación en exoADN disminuye cuando se emplean tubos de suero, reduciendo el porcentaje de metilación en uno de los casos y llegando a ser indetectable en el resto de las muestras de pacientes analizadas.

La pérdida de sensibilidad observada en suero respecto al plasma puede ser debido al aumento de VE producidas por la activación plaquetaria durante la formación del coágulo, aumentando el número de VE no tumorales procedentes de las plaquetas que darían lugar a un efecto dilucional en la cantidad de exoADN metilado procedente del tumor. Por lo tanto, si bien el tubo de suero podría ser el recurso más valioso para el estudio de VE procedentes de plaquetas, no es una opción válida para el estudio de marcadores de origen tumoral como es nuestro caso (191, 192).

Es por tanto necesario establecer métodos normalizados que aborden la variabilidad preanalítica y analítica en los estudios de los estudios con VE que permitan su reproducibilidad para hacer llegar los biomarcadores en VE a la práctica clínica.

2.2. ADNlc *versus* exoADN para la detección de la metilación de *MGMT*

Los ensayos de biopsia líquida ya son una realidad para varios tipos tumorales. Pero, a diferencia de otros tumores sólidos, en la actualidad se acepta ampliamente que la mejor fuente de biopsia líquida para los pacientes con glioma es el líquido cefalorraquídeo ya que los niveles en sangre suelen ser bajos y detectables sólo en algunos casos (126). Sin embargo, este abordaje conlleva mayor riesgo para el paciente en comparación con la obtención de muestra de sangre periférica (193).

Los resultados en el análisis de biomarcadores dependen en gran medida tanto del tipo de tumor como de su estadio y localización, pudiendo obtener sensibilidades de más del 90% en pacientes metastásicos (194). En los últimos años, muchos investigadores han tratado de

determinar la metilación de *MGMT* en biopsia líquida a través del uso del ADNlc en pacientes con gliomas de diferentes grados. Sin embargo, la sensibilidad obtenida hasta la fecha ha sido muy limitada (116, 118, 195-198) (**Tabla 15**):

Año publicación	Artículo (PMID)	% S	% E	N	Cáncer	Muestra de sangre	Técnica
2019	31366977 (116)	31 % (plasma)	38 % (plasma)	74	Glioma (IV)	Post Qx	MSP Pirosecuenciación
2017	29100349 (195)	76,61% (suero)	98,28 % (suero)	59	Glioma (II, III, IV)	Pre Qx	Secuenciación
2015	26171163 (196)	37,3 % (suero)	100 % (suero)	89	Glioma (II, III, IV)	Post Qx	PCR + HPLC
2013	23661397 (118)	11 % (suero)	100 % (suero)	9	Glioma (II, III, IV)	No especificado	MSP
2010	20150384 (197)	59 % (suero)	100 % (suero)	41	Glioma (II, III, IV)	No especificado	qMSP (B-actina)
2010	20154338 (198)	73,4 % (suero)	100 % (suero)	66	Glioma (III, IV)	Pre Qx	MeDIP + qPCR
2006	16466990 (119)	50 % (plasma)	100 % (plasma)	6	Glioma (II, III, IV)	Pre Qx	MSP

Tabla 15. Artículos publicados en los que se detecta la metilación gen *MGMT* en biopsia líquida. %S: porcentaje de sensibilidad. %E: porcentaje de especificidad. N: número de pacientes incluidos en el estudio. MSP: PCR específica de metilación. qMSP: PCR cuantitativa específica de metilación. HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia. MeDIP: Inmunoprecipitación de ADN metilado de alto rendimiento. qPCR: PCR cuantitativa.

Debido a la discrepancia de los resultados obtenidos hasta la fecha por los diferentes grupos de investigación, decidimos llevar a cabo el estudio de la metilación del gen *MGMT* en ADNlc para ver si con la nueva técnica desarrollada en este trabajo podíamos obtener mejores datos que los publicados hasta la fecha. Observamos que los datos obtenidos en nuestra cohorte de 21 pacientes no eran concordantes con los obtenidos en tejido, presentando una elevada tasa de falsos negativos respecto al tumor. En el mejor de los casos, empleando un punto de corte de metilación >0%, la sensibilidad alcanzada fue del 25%, resultados similares a los obtenidos en los estudios previos al analizar muestras tomadas tras la cirugía, como en nuestro caso (**Tabla 15**) (116, 196). La metilación de *MGMT* sólo pudo ser detectada en 2 de los 8 pacientes que presentaban el tumor metilado y en ambos casos los pacientes no fueron candidatos a cirugía, razón que podría explicar que en estos dos pacientes fuéramos capaces de detectar la metilación en ADNlc. Si bien es cierto que el tamaño muestral incluido en el estudio de ADNlc puede resultar bajo, la sensibilidad obtenida fue considerada como insuficiente como para continuar analizando más muestras.

Bettegowda *et al.* describieron que el ADNtc era detectable en más del 75% de los pacientes con cáncer de páncreas, ovario, colorrectal, vejiga, melanoma y cabeza y cuello, pero sólo fue detectable en menos del 10% de pacientes con gliomas (105), por lo que esta falta de

concordancia que observamos entre los resultados obtenidos en tejido y ADNlc podría deberse a la presencia de la BHE que hace que la cantidad de ADNlc que liberan estos tumores sea menor, dificultando su detección (105). Además, el ADNlc está muy fragmentado y a pesar de diseñarse específicamente unos cebadores para esta función que amplificaban 166pb, quizás no sean suficientemente pequeños como para detectar las pocas moléculas metiladas que pudieran existir (116).

Por lo tanto, en base a la limitada sensibilidad que ofrece el ADNlc en los pacientes con GB nos planteamos en este trabajo si la evaluación del exoADN podría aportar un valor clínico adicional ya que se han descrito niveles elevados de VE en circulación en pacientes con GB por lo que podrían ser una valiosa fuente de biomarcadores para este tipo tumoral (169, 199). Sin embargo, la investigación con VE aún supone un gran desafío debido a la biogénesis intrínsecamente compleja de estas vesículas y a su gran heterogeneidad en tamaño, composición y origen, así como la falta de métodos estandarizados para su aislamiento y procesamiento. De hecho, parte de la novedad de nuestro estudio recae precisamente en que la mayoría de los estudios con VE publicados hasta la fecha se han centrado en la identificación de biomarcadores basados en ARN y proteínas, por lo que el ADN asociado a VE representa una fuente de información relativamente inexplorada que aporta singularidad en el estudio del estado de metilación del marcador *MGMT*.

En nuestro estudio empleamos para el aislamiento de VE sangre extraída en tubos de EDTA porque a pesar de la falta de consenso existente sobre cuál es el mejor tubo para el aislamiento de VE, varios estudios sugieren el uso de los tubos con EDTA como el mejor medio ya que previene la formación de agregados de células EV, inhibe la liberación derivada de plaquetas y es válido para la realización de estudios moleculares (192, 200).

La técnica actual de referencia para el aislamiento de VE es la ultracentrifugación que separa y concentra las VE de otros componentes del plasma de acuerdo con su densidad. Las VE típicamente tienen una densidad de 1,13-1,19 g/ml y por lo que sedimentan a 100.000 g (200, 201). Sin embargo, uno de los aspectos desafiantes del aislamiento de VE mediante ultracentrifugación es también su falta de estandarización, complejidad técnica y tiempo de realización. Además, el plasma contiene lipoproteínas con densidades similares a las VE (1,06-1,20 g/ml) por lo que no pueden eliminarse por completo mediante ultracentrifugación, principal inconveniente para los estudios proteómicos en este compartimento (202). Por ello, se recomienda la realización de al menos dos ultracentrifugaciones, la primera con el objetivo de

sedimentar las VE y la segunda para lavar las VE con PBS y reducir la contaminación proteica en la medida de lo posible (200, 201).

Además, dado que la identificación de VE es también compleja, They *et al.* recomiendan el empleo de al menos dos técnicas para su caracterización (201). En nuestro caso, las técnicas empleadas fueron el NTA y la MET. Con el empleo del NTA observamos que nuestras VE presentan principalmente un tamaño de 121,2 nm, lo que permite confirmar la presencia de exosomas como VE mayoritaria en nuestras muestras. Además, mediante la MET confirmamos también que el tamaño observado era inferior a 200 nm y que las VE presentaban la morfología característica en forma de copa esperada para este tipo de vesícula en base a las publicaciones previas (203, 204).

La sangre es una de las fuentes más abundantes de VE, con una concentración estimada de 0,5 a $1,5 \times 10^9$ partículas/ml en individuos sanos (200). La mediana de concentración obtenida en nuestro caso fue de $1,8 \times 10^9$ partículas/ml, ligeramente superior a la descrita para los individuos sanos, sugiriendo de nuevo que los pacientes con GB liberan en mayor cantidad VE al plasma. En nuestro estudio no observamos diferencias significativas en las muestras analizadas en la concentración de VE en función de la cirugía, la RM postquirúrgica o la metilación de *MGMT*. En el estudio de Osti *et al.* advirtieron diferencias en la concentración de VE entre la muestra basal y la recidiva, por lo que cabría esperar que en nuestro caso pudiéramos observar diferencias al analizar las concentraciones de VE en base a los datos de cirugía o RM postquirúrgica. Sin embargo, no observamos este hecho, quizás debido al poco tamaño muestral (169).

Una vez caracterizados los exosomas procedimos al estudio del biomarcador *MGMT* en el ADN presente en estas vesículas. En las 47 muestras de las que se tenía tumor pareado, observamos que el porcentaje de concordancia obtenido entre las muestras de exoADN y las de tejido fue del 82,9% con una sensibilidad para detectar metilación de *MGMT* en exoADN respecto al tejido del 61,1% y especificidad del 96,6%, lo que supone una concordancia moderada con el índice kappa. Obtuvimos 7 resultados discordantes en los que la presencia de metilación en el tumor no se correspondía con detección del marcador en exoADN. En 6 de los pacientes puede deberse a la ausencia VE de origen tumoral circulantes en sangre ya que los pacientes fueron sometidos a una resección macroscópicamente completa y las muestras de sangre fueron recogidas al inicio del tratamiento, es decir, un mes aproximadamente tras la resección. El séptimo paciente fue sometido a una resección macroscópicamente incompleta, quedando muy pocos restos tumorales, lo que podría dificultar su detección en sangre. Si hubiera sido posible obtener de todos nuestros pacientes muestra de sangre previa a la cirugía, esta limitación probablemente

no hubiera estado presente y, por lo tanto, sería esperable que la sensibilidad obtenida en exoADN fuera incluso aún mayor. Osti *et al.* ya demostraron en muestras de plasma GB recogidas antes y después de la operación en 14 pacientes, que los niveles de VE se redujeron significativamente en las muestras postoperatorias, confirmando la hipótesis previa (169). Por lo que reanalizamos nuestra cohorte excluyendo a los pacientes que habían sido sometidos a resección completa, obteniendo un aumento considerable en la sensibilidad al alcanzar el 85,7%; superior a la lograda hasta la fecha cuando se ha empleado ADNlc para tratar de determinar *MGMT* en biopsia líquida, mejor incluso que los estudios en los que la muestra se ha tomado previa a la cirugía (119, 195, 198).

Cuando analizamos los estudios publicados en los que se compara de manera paralela los resultados en exoADN *versus* ADNlc sólo encontramos dos. El estudio de Allenson *et al.* detecta una mayor tasa de mutaciones de *KRAS* en el ADN exosomal respecto al ADNlc por PCR digital con sensibilidades en exoADN de 66,7%, 80% y 85% de los pacientes con cáncer de páncreas localizados, localmente avanzados y metastásicos, respectivamente; mientras que en el ADNlc se detectó en el 45,5%, 30,8% y 57,9% de estos individuos (157). Por su parte, Bernard *et al.*, también en pacientes con cáncer de páncreas, detectaron mutaciones de *KRAS* en 61% y 53% en enfermedad metastásica y 38% y 34% en enfermedad localizada para exoADN y ADNlc, respectivamente (205). En nuestro caso, disponíamos de 13 muestras pareadas en las que teníamos datos de metilación en ADNlc, exoADN y tumor. En 3 de las muestras se detectó metilación en el tumor, coincidiendo con el resultado en exoADN, sin embargo, sólo en una de las muestras se detectó en el ADNlc, siendo la que presentaba mayor valor de metilación en exoADN. Nuestros datos, por tanto, avalan los publicados por Allenson *et al.* y Bernard *et al.*, confirmando que la capacidad de detección de biomarcadores es mayor en exoADN que en ADNlc.

Además, en el caso de los pacientes con GB, parece que la protección que ofrecen los exosomas a los ácidos nucleicos supone una gran ventaja sobre la biopsia líquida basada en ADNlc ya que la bicapa lipídica permite su paso a través de la BHE haciendo que sean partículas con un gran potencial como fuente de estudio para valorar marcadores moleculares especialmente en este tipo tumoral. A su vez, el estudio llevado a cabo por Fernando MR *et al.* muestra que el 90% del ADNlc en plasma se encuentran en los exosomas (206), lo que ayudaría también a explicar por qué intentos sucesivos han fallado en la detección del biomarcador *MGMT* en biopsia líquida y por qué su estudio a través del uso de exoADN tiene la mayor sensibilidad para la detección de *MGMT* descrita hasta la fecha.

En los 3 pacientes en los que la resección fue informada como macroscópicamente completa y la metilación fue detectada en sangre, el resultado de exoADN podría indicar la presencia de restos tumorales, usándose de este modo el resultado en exoADN como prueba complementaria a la RM postquirúrgica para ayudar al manejo del paciente.

Lograr la máxima sensibilidad en las pruebas de biopsia líquida es complejo, especialmente en aquellos casos de baja carga tumoral como pueden ser los estadios precoces (105). Sin embargo, la falta de especificidad no es un evento común y suele ir asociado a falsos negativos en las muestras de tejido (194). En nuestro caso, detectamos que el paciente 69 presentaba en exoADN metilación de *MGMT* y sin embargo no fue detectada en tejido. Este paciente, a pesar de no ser candidato a cirugía, presentó una SLP de 11,1 meses, mucho más larga de la SLP esperada para un paciente sometido a biopsia, por lo que cabría esperar que el paciente presentara *MGMT* metilado como indicaba la muestra de exoADN y el resultado en tumor correspondiera a un falso negativo. Asimismo, dado que la presencia de metilación de *MGMT* sólo ha sido descrita asociada a procesos tumorales y nosotros hemos confirmado que no se encuentra presente en exoADN procedente de pacientes sanos, la presencia de metilación en *MGMT* sólo podría atribuirse a la existencia de un proceso tumoral en el paciente, avalando el resultado encontrado en exoADN frente al observado en tumor. Previamente se ha reportado en diferentes estudios que la principal limitación que ofrece la obtención de muestra de tejido es la heterogeneidad tumoral ya que es difícil que una única muestra represente la lesión completa. Gerlinger *et al.* ya demostraron que entre el 60% y el 70% de las mutaciones identificadas en un tumor no estaban presentes en todas las regiones del tumor (99). En los pacientes con gliomas este hecho también ha sido previamente reportado por Parker *et al.* observando en un 14% de las muestras analizadas variabilidad en el estado de metilación de *MGMT* según la zona del tumor estudiada (95).

En nuestra cohorte tenemos dos pacientes en los que se detectó la metilación de *MGMT* pero en los que no fue posible obtener muestra tumoral suficiente para el estudio de biomarcadores en tejido. El paciente 118, no fue candidato a cirugía ni a tratamiento por su mal estado general, por lo que no se puede valorar el efecto de la metilación como marcador predictivo de respuesta en este paciente. Por su parte, el paciente 121 fue sometido a una resección incompleta que explicaría la posible identificación de la metilación *MGMT* en VE y, de manera similar a lo que ocurrió con el paciente 69, presentó una SLP de 11,1 meses, supervivencia que se encuadra dentro de la SLP esperada para los pacientes con *MGMT* metilado tratados.

En nuestra cohorte de 53 pacientes, el uso de exoADN aumentó la detección de la metilación de *MGMT* en 3 pacientes, lo que supone que el uso del exoADN rescataría un 5% de pacientes que estarían infradiagnosticados por ausencia de tumor o heterogeneidad tumoral. Por lo tanto, los estudios de exoADN se presentarían como una herramienta fundamental en el diagnóstico de GB inoperables donde la biopsia de tejido puede ser difícil o en ocasiones imposible, reinventando el diagnóstico clínico de los pacientes con GB y abriendo nuevas posibilidades de biopsia líquida en pacientes donde el ADNlc ha fallado.

Hasta la fecha, sólo existe un estudio que emplee exoADN en pacientes con GB. Este estudio fue publicado por García-Romero *et al.* en 2017 donde muestran que son capaces de detectar mutaciones de *IDH* en exoADN en un modelo animal de ratón y en pacientes con gliomas. En su estudio observan que las mutaciones de *IDH* se detectan en exoADN no sólo en los pacientes que presentan disrupción de la BHE, hecho frecuente en los pacientes con GB, sino también en aquellos pacientes con gliomas de bajo grado con la BHE intacta, confirmando que los exosomas pueden atravesar libremente la BHE (167) y podrían por tanto ser una herramienta para seguimiento de pacientes con tumores del SNC.

Según nuestro conocimiento, nuestro estudio muestra por primera vez que es posible la detección de metilación de *MGMT* en exoADN procedente de plasma de pacientes con GB y es el segundo estudio que muestra detección de metilación en exoADN de pacientes con cáncer. El primer estudio ha sido publicado recientemente (febrero de 2021) por Zavridou M *et al.* en el que detectan por primera vez metilación en exoADN para los genes *GSTP1* y *RASSF1A* en pacientes con cáncer de próstata y observan que la metilación se correlacionó significativamente con una SG menor (207). Por su parte, Maire *et al.*, también en 2021, han observado que el perfil de metilación en exoADN proceden de VE derivadas de células de GB en cultivo logran clasificar correctamente los tumores de acuerdo con la clasificación de Heidelberg (208), clasificación que permite caracterizar los tumores cerebrales desconocidos según el perfil de metilación que presentan en el array de metilación 850K (Arrays Infinium EPIC 850K, Illumina) (209).

3. Uso de exoADN en la monitorización de pacientes con glioblastoma

Los tumores son entidades dinámicas que evolucionan rápidamente y modifican sus perfiles genotípicos y fenotípicos para ganar resistencia a un determinado tratamiento, por lo que contar con una plataforma fiable que permita la evaluación en tiempo real de los cambios que ocurren

en el tumor primario es muy valioso. La biopsia líquida permitiría que muchos más fármacos dirigidos se probaran en ensayos clínicos y finalmente llegaran a la clínica ya que presenta la facilidad asociada a monitorizar la respuesta al tratamiento de una forma más eficaz y personalizada (114).

Un biomarcador que puede evaluarse repetidamente a lo largo del tiempo se denomina biomarcador de seguimiento y se puede utilizar para evaluar (180):

- Progresión de la enfermedad, incluida la aparición de nuevos efectos de la enfermedad, empeoramiento de anomalías previamente existentes o cambio en la gravedad de la enfermedad o anomalías específicas.
- Respuesta de una enfermedad o afección a un tratamiento, ya sea favorable o desfavorable.
- Selección de tratamientos cuando no hay muestra tumoral disponible.

Por lo tanto, este enfoque tiene variadas aplicaciones clínicas potenciales, incluido el diagnóstico primario, la selección de la estrategia de tratamiento, la evolución de la enfermedad y el seguimiento de la progresión (180).

Sin embargo, hasta el momento no ha sido bien establecido el papel que la biopsia líquida pueda jugar en el seguimiento de pacientes con gliomas ya que existen muy pocos estudios disponibles y con pocos pacientes. En un subgrupo de 12 pacientes, Bagley *et al.* informaron que los niveles de ADNlc aumentaron en los pacientes con progresión y permanecieron estables en pacientes que no progresaron (210), datos que fueron corroborados posteriormente en el estudio de Fontanilles *et al.* (211). Por su parte, Muralidharan *et al.* monitorizaron mutaciones de TERT en ADNlc en 5 pacientes, concluyendo que la frecuencia de estas refleja el curso clínico de la enfermedad con niveles que disminuyen después de la intervención quirúrgica y aumentan con la progresión del tumor (121). Datos similares fueron reportados por Osti *et al.* pero midiendo en su caso niveles de concentración de VE en vez de ADNlc (169).

En nuestro estudio tenemos 9 pacientes en los que se disponía de muestra previa al inicio del tratamiento y al menos una muestra de seguimiento. Hubo un paciente en el que no se disponía de muestra basal pero sí de dos muestras de seguimiento. De estos pacientes, 7 presentaron metilación en el tumor y en 5 pudimos ver la metilación en la muestra basal o en la primera muestra de seguimiento. En aquellos casos en los que la metilación estuvo presente y después no se detectó coincidió con una mejor respuesta al tratamiento con TMZ, mientras que en los casos en los que la metilación continuó detectable en varias de las muestras obtenidas durante

el seguimiento se trató de pacientes que progresaron. En los 2 pacientes en los que la metilación en sangre no fue detectada pero sí en tumor, coincide con pacientes con resección completa y muy buena respuesta al tratamiento, por lo que la ausencia del biomarcador en sangre cuando está presente en tumor indicaría una excelente respuesta al tratamiento.

Monitorizar la respuesta del paciente al tratamiento es un desafío para la mayoría de los tumores pero supone un gran reto en el GB. Actualmente, el seguimiento de estos pacientes se realiza mediante RM, un enfoque efectivo pero que puede resultar complejo debido a existencia frecuente del fenómeno de pseudoprogresión, no pudiéndose distinguir en ocasiones la progresión del tumor de la necrosis y/o inflamación producida tras el tratamiento con radioterapia. Por tanto, existe una gran necesidad de herramientas mínimamente invasivas que permitan caracterizar los tumores y al mismo tiempo ayudar en la identificación de la verdadera progresión respecto a la pseudoprogresión. En este sentido, el empleo del exoADN podría ayudar a mejorar la sensibilidad y la especificidad que ofrecen actualmente las pruebas de imagen en esta patología, hecho de vital importancia para el manejo de estos pacientes y que puede afectar significativamente a su supervivencia (212, 213).

La próxima frontera para la aplicación clínica del exoADN sería la indicación de biomarcador para cambio de tratamiento tras la detección de recaída. Los datos publicados en el ensayo CheckMate 143 tras un análisis de subgrupos indicaron que los pacientes con GB recurrente y promotor *MGMT* metilado y sin uso de corticoides pueden obtener un beneficio potencial del tratamiento basado en inmunoterapia con nivolumab. Dado que en estos pacientes la rebiopsia no es un evento frecuente, poder detectar la metilación en exoADN en la recurrencia podría ser un buen biomarcador para seleccionar a los pacientes candidatos a tratamiento con nivolumab (214).

Si bien es cierto que con nuestro abordaje sólo podríamos monitorizar a los pacientes con *MGMT* metilado, el uso del exoADN podría emplearse para monitorizar otros biomarcadores previamente descritos en GB como el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), la fosfatasa de fosfatidilinositoltrisfosfato (PTEN) o la transcriptasa inversa de telomerasa (TERT) mejorando la sensibilidad obtenida hasta la fecha cuando se ha empleado ADNtc (215).

Dado que la infradetección molecular no solo da como resultado la pérdida de oportunidades de tratamiento, sino también el uso inadecuado de terapias que probablemente no sean efectivas, la monitorización mediante muestras de biopsia líquida a través de exoADN proporciona información predictiva relevante para ayudar al manejo y monitorizar la evolución de los pacientes con GB.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La técnica cuantitativa para determinar la metilación del gen *MGMT* desarrollada en este trabajo es comparable a la técnica clásica y permite clasificar a los pacientes en respondedores y no respondedores al tratamiento con temozolamida en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global.
2. La PCR cuantitativa de metilación proporciona un porcentaje de metilación con un punto de corte definido que facilita su estandarización y hace que sea una técnica adecuada para su uso en el diagnóstico clínico.
3. La metilación de *MGMT* analizada en ADN libre circulante es poco sensible y presenta una elevada tasa de falsos negativos respecto al ADN valorado en el tumor por lo que no resulta útil para el manejo de los pacientes con glioblastoma.
4. En este trabajo se evalúa por primera vez en biopsia líquida la metilación del gen *MGMT* en ADN exosomal, obteniendo resultados concordantes respecto al análisis realizado en el tejido y proporcionando una fuente de información adicional en esta patología.
5. En este trabajo se alcanza un 85,7% de sensibilidad en la detección de la metilación de *MGMT* cuando se emplea ADN exosomal procedente de pacientes que han sido sometidos a resección parcial. Este resultado es superior al logrado hasta la fecha, mejorando incluso los estudios en los que la muestra de sangre se ha tomado previa a la cirugía.
6. Las variables preanalíticas se consideran una parte crucial de las investigaciones con vesículas extracelulares y deben ser consideradas en los estudios de ADN exosomal. En este trabajo observamos mayor sensibilidad de la técnica cuando el ADN analizado procede de plasma en comparación con el obtenido de suero, siendo por tanto recomendable el uso de tubos de EDTA.
7. La monitorización de la metilación de *MGMT* a través del uso de ADN exosomal en muestras de biopsia líquida proporciona una herramienta adicional a las pruebas de imagen aportando información predictiva relevante para el manejo y la evolución de los pacientes con glioblastoma.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2014;16 Suppl 4:iv1-63.
2. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008;359(5):492-507.
3. Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G, Group EGW. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014;25 Suppl 3:iii93-101.
4. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):e315-e29.
5. Vogelbaum MA, Jost S, Aghi MK, Heimberger AB, Sampson JH, Wen PY, et al. Application of novel response/progression measures for surgically delivered therapies for gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) Working Group. *Neurosurgery.* 2012;70(1):234-43; discussion 43-4.
6. Yousaf T, Dervenoulas G, Politis M. Advances in MRI Methodology. *Int Rev Neurobiol.* 2018;141:31-76.
7. Mitra S, Banerjee S, Hayashi Y. Volumetric brain tumour detection from MRI using visual saliency. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187209.
8. Cha S, Lupo JM, Chen MH, Lamborn KR, McDermott MW, Berger MS, et al. Differentiation of glioblastoma multiforme and single brain metastasis by peak height and percentage of signal intensity recovery derived from dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2007;28(6):1078-84.
9. Lee J, Wang N, Turk S, Mohammed S, Lobo R, Kim J, et al. Discriminating pseudoprogression and true progression in diffuse infiltrating glioma using multi-parametric MRI data through deep learning. *Sci Rep.* 2020;10(1):20331.
10. Majos C, Aguilera C, Alonso J, Julia-Sape M, Castaner S, Sanchez JJ, et al. Proton MR spectroscopy improves discrimination between tumor and pseudotumoral lesion in solid brain masses. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30(3):544-51.
11. Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S, et al. Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003;24(10):1989-98.
12. Jessen KR. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(10):1861-7.
13. D'Alessio A, Proietti G, Sica G, Scicchitano BM. Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue. *Cancers (Basel).* 2019;11(4).
14. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
15. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th Edition. David N. Louis. 2016.
16. Louis DN, Wesseling P, Paulus W, Giannini C, Batchelor TT, Cairncross JG, et al. cIMPACT-NOW update 1: Not Otherwise Specified (NOS) and Not Elsewhere Classified (NEC). *Acta Neuropathol.* 2018;135(3):481-4.
17. Louis DN, Giannini C, Capper D, Paulus W, Figarella-Branger D, Lopes MB, et al. cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta Neuropathol.* 2018;135(4):639-42.
18. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol.* 2018;136(5):805-10.
19. Ellison DW, Hawkins C, Jones DTW, Onar-Thomas A, Pfister SM, Reifenberger G, et al. cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAF(V600E) mutation. *Acta Neuropathol.* 2019;137(4):683-7.
20. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giannini C, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 2020;139(3):603-8.
21. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Cree IA, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2020;30(4):844-56.

22. Ellison DW, Aldape KD, Capper D, Fouladi M, Gilbert MR, Gilbertson RJ, et al. cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain Pathol.* 2020;30(5):863-6.
23. Aibaidula A, Chan AK, Shi Z, Li Y, Zhang R, Yang R, et al. Adult IDH wild-type lower-grade gliomas should be further stratified. *Neuro Oncol.* 2017;19(10):1327-37.
24. Aoki K, Nakamura H, Suzuki H, Matsuo K, Kataoka K, Shimamura T, et al. Prognostic relevance of genetic alterations in diffuse lower-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2018;20(1):66-77.
25. Shirahata M, Ono T, Stichel D, Schrimpf D, Reuss DE, Sahm F, et al. Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol.* 2018;136(1):153-66.
26. Bush NA, Chang SM, Berger MS. Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurg Rev.* 2017;40(1):1-14.
27. Leroy HA, Vermandel M, Lejeune JP, Mordon S, Reyns N. Fluorescence guided resection and glioblastoma in 2015: A review. *Lasers Surg Med.* 2015;47(5):441-51.
28. Lau D, Hervey-Jumper SL, Chang S, Molinaro AM, McDermott MW, Phillips JJ, et al. A prospective Phase II clinical trial of 5-aminolevulinic acid to assess the correlation of intraoperative fluorescence intensity and degree of histologic cellularity during resection of high-grade gliomas. *J Neurosurg.* 2016;124(5):1300-9.
29. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):392-401.
30. Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K, Reulen HJ. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg.* 2000;93(6):1003-13.
31. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg.* 2001;95(2):190-8.
32. McGirt MJ, Chaichana KL, Gathinji M, Attenello FJ, Than K, Olivi A, et al. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. *J Neurosurg.* 2009;110(1):156-62.
33. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg.* 2011;115(1):3-8.
34. Brzozowska A, Torun A, Mazurkiewicz M. The impact of surgery on the efficacy of adjuvant therapy in glioblastoma multiforme. *Adv Clin Exp Med.* 2015;24(2):279-87.
35. Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams HP, Kunze S. Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery.* 1994;34(1):45-60; discussion -1.
36. Vecht CJ, Avezaat CJ, van Putten WL, Eijkenboom WM, Stefanko SZ. The influence of the extent of surgery on the neurological function and survival in malignant glioma. A retrospective analysis in 243 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1990;53(6):466-71.
37. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
38. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-66.
39. Tisdale MJ. Antitumor imidazotetrazines--XI: Effect of 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one [CCRG 81045; M and B 39831 NSC 362856] on poly(ADP-ribose) metabolism. *Br J Cancer.* 1985;52(5):789-92.
40. Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, et al. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res.* 1987;47(22):5846-52.
41. Schreck KC, Grossman SA. Role of Temozolomide in the Treatment of Cancers Involving the Central Nervous System. *Oncology (Williston Park).* 2018;32(11):555-60, 69.
42. Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CF, et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced ADN lesion O6-methylguanine. *Oncogene.* 2007;26(2):186-97.

43. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the ADN repair gene O6-methylguanine-ADN methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999;59(4):793-7.
44. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the ADN-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000;343(19):1350-4.
45. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003.
46. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, et al. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med.* 2007;356(15):1527-35.
47. Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):916-26.
48. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(7):707-15.
49. Criterios de respuesta de los tumores cerebrales. Grupo Neuro-oncología Sociedad Española de Neurorradiología. 2011.
50. Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, Jr., Cairncross JG. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol.* 1990;8(7):1277-80.
51. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol.* 2010;28(11):1963-72.
52. de Wit MC, de Bruin HG, Eijkenboom W, Sillevius Smitt PA, van den Bent MJ. Immediate post-radiotherapy changes in malignant glioma can mimic tumor progression. *Neurology.* 2004;63(3):535-7.
53. Hottinger AF, Levivier M, Negretti L, Homicsko K, Stupp R. PET Imaging in Glioma: The Neuro-Oncologist's Expectations. *PET Clin.* 2013;8(2):117-28.
54. Chaul-Barbosa C, Marques DF. How We Treat Recurrent Glioblastoma Today and Current Evidence. *Curr Oncol Rep.* 2019;21(10):94.
55. Hou LC, Veeravagu A, Hsu AR, Tse VC. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg Focus.* 2006;20(4):E5.
56. Ringel F, Pape H, Sabel M, Krex D, Bock HC, Misch M, et al. Clinical benefit from resection of recurrent glioblastomas: results of a multicenter study including 503 patients with recurrent glioblastomas undergoing surgical resection. *Neuro Oncol.* 2016;18(1):96-104.
57. Johnson DR, Omuro AMP, Ravelo A, Sommer N, Guerin A, Ionescu-Ittu R, et al. Overall survival in patients with glioblastoma before and after bevacizumab approval. *Curr Med Res Opin.* 2018;34(5):813-20.
58. Jungk C, Chatziaslanidou D, Ahmadi R, Capper D, Bermejo JL, Exner J, et al. Chemotherapy with BCNU in recurrent glioma: Analysis of clinical outcome and side effects in chemotherapy-naive patients. *BMC Cancer.* 2016;16:81.
59. Weller M, Tabatabai G, Kastner B, Felsberg J, Steinbach JP, Wick A, et al. MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin Cancer Res.* 2015;21(9):2057-64.
60. Franceschi E, Lamberti G, Visani M, Paccapelo A, Mura A, Tallini G, et al. Temozolomide rechallenge in recurrent glioblastoma: when is it useful? *Future Oncol.* 2018;14(11):1063-9.
61. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol.* 2012;41(1):10-3.
62. Nanney DL. Epigenetic Control Systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1958;44(7):712-7.
63. Holliday R. Epigenetics: an overview. *Dev Genet.* 1994;15(6):453-7.
64. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007;447(7143):396-8.
65. Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature.* 2019;571(7766):489-99.
66. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1057-68.
67. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(30):10604-9.

68. Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, et al. Changes in the pattern of ADN methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res.* 2010;20(2):170-9.
69. Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(5):564-71.
70. Ambrosi C, Manzo M, Baubec T. Dynamics and Context-Dependent Roles of ADN Methylation. *J Mol Biol.* 2017;429(10):1459-75.
71. Benbrahim-Tallaa L, Waterland RA, Dill AL, Webber MM, Waalkes MP. Tumor suppressor gene inactivation during cadmium-induced malignant transformation of human prostate cells correlates with overexpression of de novo ADN methyltransferase. *Environ Health Perspect.* 2007;115(10):1454-9.
72. Kulis M, Esteller M. ADN methylation and cancer. *Adv Genet.* 2010;70:27-56.
73. Lopez-Serra L, Esteller M. Proteins that bind methylated ADN and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer.* 2008;98(12):1881-5.
74. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 1983;301(5895):89-92.
75. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, et al. The 5-methylcytosine content of ADN from human tumors. *Nucleic Acids Res.* 1983;11(19):6883-94.
76. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349(21):2042-54.
77. Lopez-Serra P, Esteller M. ADN methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene.* 2012;31(13):1609-22.
78. Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet.* 1989;83(2):155-8.
79. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the ADN hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No 1:R50-9.
80. Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, et al. Sensitive digital quantification of ADN methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol.* 2009;27(9):858-63.
81. Cankovic M, Nikiforova MN, Snuderl M, Adesina AM, Lindeman N, Wen PY, et al. The role of MGMT testing in clinical practice: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2013;15(5):539-55.
82. Malley DS, Hamoudi RA, Kocalkowski S, Pearson DM, Collins VP, Ichimura K. A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma cells and xenografts. *Acta Neuropathol.* 2011;121(5):651-61.
83. Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, Criniere E, Busato F, Marie Y, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2009;11(4):348-56.
84. Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, van den Bent MJ, Marosi C, et al. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol.* 2012;124(4):547-60.
85. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual ADN strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(5):1827-31.
86. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, et al. Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PLoS One.* 2012;7(3):e33449.
87. Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, Carpentier C, Labussiere M, Lesimple T, et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-ADN-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer.* 2012;118(17):4201-11.
88. Bienkowski M, Berghoff AS, Marosi C, Wohrer A, Heinzl H, Hainfellner JA, et al. Clinical Neuropathology practice guide 5-2015: MGMT methylation pyrosequencing in glioblastoma: unresolved issues and open questions. *Clin Neuropathol.* 2015;34(5):250-7.

89. Yoshioka M, Matsutani T, Hara A, Hirono S, Hiwasa T, Takiguchi M, et al. Real-time methylation-specific PCR for the evaluation of methylation status of MGMT gene in glioblastoma. *Oncotarget*. 2018;9(45):27728-35.
90. Barault L, Amatu A, Bleeker FE, Moutinho C, Falcomata C, Fiano V, et al. Digital PCR quantification of MGMT methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(9):1994-9.
91. Park CK, Kim J, Yim SY, Lee AR, Han JH, Kim CY, et al. Usefulness of MS-MLPA for detection of MGMT promoter methylation in the evaluation of pseudoprogression in glioblastoma patients. *Neuro Oncol*. 2011;13(2):195-202.
92. Wenger A, Ferreyra Vega S, Kling T, Bontell TO, Jakola AS, Caren H. Intratumor ADN methylation heterogeneity in glioblastoma: implications for ADN methylation-based classification. *Neuro Oncol*. 2019;21(5):616-27.
93. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol*. 2010;6(1):39-51.
94. Riemenschneider MJ, Fischer J, Grassow-Narlik M, Mawrin C, von Deimling A, Pietsch T, et al. Quality assurance in neuropathology: Experiences from the round robin trials on IDH mutation and MGMT promoter methylation testing launched by the Quality Assurance Initiative Pathology (QuIP) in 2018 and 2019. *Clin Neuropathol*. 2020;39(5):203-11.
95. Parker NR, Hudson AL, Khong P, Parkinson JF, Dwight T, Ikin RJ, et al. Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Sci Rep*. 2016;6:22477.
96. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):472-84.
97. Vaidyanathan R, Soon RH, Zhang P, Jiang K, Lim CT. Cancer diagnosis: from tumor to liquid biopsy and beyond. *Lab Chip*. 2018;19(1):11-34.
98. Mader S, Pantel K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Oncol Res Treat*. 2017;40(7-8):404-8.
99. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883-92.
100. Alix-Panabières, C., Pantel, K. Clinical prospects of liquid biopsies. *Nat Biomed Eng* 1, 0065. 2017.
101. Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948;142(3-4):241-3.
102. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free ADN in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977;37(3):646-50.
103. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):426-37.
104. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating ADN in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(3):347-76.
105. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor ADN in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24.
106. Neumann MHD, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctADN and CTCs in Liquid Biopsy - Current Status and Where We Need to Progress. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:190-5.
107. Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, Moore EK, Morris J, Ahlborn LB, et al. Enhanced detection of circulating tumor ADN by fragment size analysis. *Sci Transl Med*. 2018;10(466).
108. Greytak SR, Engel KB, Parpart-Li S, Murtaza M, Bronkhorst AJ, Pertile MD, et al. Harmonizing Cell-Free ADN Collection and Processing Practices through Evidence-Based Guidance. *Clin Cancer Res*. 2020;26(13):3104-9.
109. Geurickx E, Hendrix A. Targets, pitfalls and reference materials for liquid biopsy tests in cancer diagnostics. *Mol Aspects Med*. 2020;72:100828.
110. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, et al. Circulating Tumor ADN Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol*. 2018;36(16):1631-41.
111. Pittella-Silva F, Chin YM, Chan HT, Nagayama S, Miyauchi E, Low SK, et al. Plasma or Serum: Which Is Preferable for Mutation Detection in Liquid Biopsy? *Clin Chem*. 2020;66(7):946-57.
112. Grolz D, Hauch S, Schlumpberger M, Guenther K, Voss T, Sprenger-Haussels M, et al. Liquid Biopsy Preservation Solutions for Standardized Pre-Analytical Workflows-Venous Whole Blood and Plasma. *Curr Pathobiol Rep*. 2018;6(4):275-86.

113. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(9):531-48.
114. Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic - implementation issues and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021.
115. Muller Bark J, Kulasinghe A, Chua B, Day BW, Punyadeera C. Circulating biomarkers in patients with glioblastoma. *Br J Cancer*. 2020;122(3):295-305.
116. Estival A, Sanz C, Ramirez JL, Velarde JM, Domenech M, Carrato C, et al. Pyrosequencing versus methylation-specific PCR for assessment of MGMT methylation in tumor and blood samples of glioblastoma patients. *Sci Rep*. 2019;9(1):11125.
117. Balana C, Ramirez JL, Taron M, Roussos Y, Ariza A, Ballester R, et al. O6-methyl-guanine-ADN methyltransferase methylation in serum and tumor ADN predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. 2003;9(4):1461-8.
118. Majchrzak-Celinska A, Paluszczak J, Kleszcz R, Magiera M, Barciszewska AM, Nowak S, et al. Detection of MGMT, RASSF1A, p15INK4B, and p14ARF promoter methylation in circulating tumor-derived ADN of central nervous system cancer patients. *J Appl Genet*. 2013;54(3):335-44.
119. Weaver KD, Grossman SA, Herman JG. Methylated tumor-specific ADN as a plasma biomarker in patients with glioma. *Cancer Invest*. 2006;24(1):35-40.
120. Piccioni DE, Achrol AS, Kiedrowski LA, Banks KC, Boucher N, Barkhoudarian G, et al. Analysis of cell-free circulating tumor ADN in 419 patients with glioblastoma and other primary brain tumors. *CNS Oncol*. 2019;8(2):CNS34.
121. Muralidharan K, Yekula A, Small JL, Rosh ZS, Kang KM, Wang L, et al. TERT Promoter Mutation Analysis for Blood-Based Diagnosis and Monitoring of Gliomas. *Clin Cancer Res*. 2021;27(1):169-78.
122. Pan W, Gu W, Nagpal S, Gephart MH, Quake SR. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. *Clin Chem*. 2015;61(3):514-22.
123. Wang Y, Springer S, Zhang M, McMahon KW, Kinde I, Dobbyn L, et al. Detection of tumor-derived ADN in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(31):9704-9.
124. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, Weigelt B, Martinez-Ricarte F, Torrejon D, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour ADN better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun*. 2015;6:8839.
125. Miller AM, Shah RH, Pentsova EI, Pourmaleki M, Briggs S, Distefano N, et al. Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid. *Nature*. 2019;565(7741):654-8.
126. Simonelli M, Dipasquale A, Orzan F, Lorenzi E, Persico P, Navarra P, et al. Cerebrospinal fluid tumor ADN for liquid biopsy in glioma patients' management: Close to the clinic? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;146:102879.
127. Allan D, Billah MM, Finean JB, Michell RH. Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular (Ca²⁺). *Nature*. 1976;261(5555):58-60.
128. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213-28.
129. Jafari A, Babajani A, Abdollahpour-Alitappeh M, Ahmadi N, Rezaei-Tavirani M. Exosomes and cancer: from molecular mechanisms to clinical applications. *Med Oncol*. 2021;38(4):45.
130. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded ADN in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*. 2014;24(6):766-9.
131. Sharma A, Johnson A. Exosome ADN: Critical regulator of tumor immunity and a diagnostic biomarker. *J Cell Physiol*. 2020;235(3):1921-32.
132. Kalluri R, LeBleu VS. Discovery of Double-Stranded Genomic ADN in Circulating Exosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2016;81:275-80.
133. Shi J, Zhang Y, Yao B, Sun P, Hao Y, Piao H, et al. Role of Exosomes in the Progression, Diagnosis, and Treatment of Gliomas. *Med Sci Monit*. 2020;26:e924023.
134. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*. 2019;177(2):428-45 e18.
135. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res*. 2017;120(10):1632-48.
136. Jamaly S, Ramberg C, Olsen R, Latysheva N, Webster P, Sovershaev T, et al. Impact of preanalytical conditions on plasma concentration and size distribution of extracellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Sci Rep*. 2018;8(1):17216.

137. Fendl B, Weiss R, Fischer MB, Spittler A, Weber V. Characterization of extracellular vesicles in whole blood: Influence of pre-analytical parameters and visualization of vesicle-cell interactions using imaging flow cytometry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;478(1):168-73.
138. Elsharkawi F, Elsbah M, Shabayek M, Khaled H. Urine and Serum Exosomes as Novel Biomarkers in Detection of Bladder Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(7):2219-24.
139. Wang N, Wang L, Yang Y, Gong L, Xiao B, Liu X. A serum exosomal microRNA panel as a potential biomarker test for gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;493(3):1322-8.
140. Lan F, Qing Q, Pan Q, Hu M, Yu H, Yue X. Serum exosomal miR-301a as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma. *Cell Oncol (Dordr).* 2018;41(1):25-33.
141. Sohn W, Kim J, Kang SH, Yang SR, Cho JY, Cho HC, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med.* 2015;47:e184.
142. Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, Yamada T, Tsuda I. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *J Clin Lab Anal.* 1999;13(3):133-40.
143. Garcia ME, Blanco JL, Caballero J, Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1567-8.
144. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013;2.
145. Yuana Y, Boing AN, Grootemaat AE, van der Pol E, Hau CM, Cizmar P, et al. Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:29260.
146. Jeyaram A, Jay SM. Preservation and Storage Stability of Extracellular Vesicles for Therapeutic Applications. *AAPS J.* 2017;20(1):1.
147. Soekmadji C, Li B, Huang Y, Wang H, An T, Liu C, et al. The future of Extracellular Vesicles as Theranostics - an ISEV meeting report. *J Extracell Vesicles.* 2020;9(1):1809766.
148. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell.* 2016;30(6):836-48.
149. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012;18(6):883-91.
150. Wang JC, Begin LR, Berube NG, Chevalier S, Aprikian AG, Gourdeau H, et al. Down-regulation of CD9 expression during prostate carcinoma progression is associated with CD9 mRNA modifications. *Clin Cancer Res.* 2007;13(8):2354-61.
151. Jang HI, Lee H. A decrease in the expression of CD63 tetraspanin protein elevates invasive potential of human melanoma cells. *Exp Mol Med.* 2003;35(4):317-23.
152. Sandfeld-Paulsen B, Jakobsen KR, Baek R, Folkersen BH, Rasmussen TR, Meldgaard P, et al. Exosomal Proteins as Diagnostic Biomarkers in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(10):1701-10.
153. Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One.* 2010;5(10):e13515.
154. Vasconcelos MH, Caires HR, Abols A, Xavier CPR, Line A. Extracellular vesicles as a novel source of biomarkers in liquid biopsies for monitoring cancer progression and drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2019;47:100647.
155. Lee JS, Hur JY, Kim IA, Kim HJ, Choi CM, Lee JC, et al. Liquid biopsy using the supernatant of a pleural effusion for EGFR genotyping in pulmonary adenocarcinoma patients: a comparison between cell-free ADN and extracellular vesicle-derived ADN. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1236.
156. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, et al. Identification of double-stranded genomic ADN spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 ADN in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem.* 2014;289(7):3869-75.
157. Allenson K, Castillo J, San Lucas FA, Scelo G, Kim DU, Bernard V, et al. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived ADN from early-stage pancreatic cancer patients. *Ann Oncol.* 2017;28(4):741-7.
158. El Andaloussi S, Lakhali S, Mager I, Wood MJ. Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(3):391-7.
159. Pan S, Yang X, Jia Y, Li R, Zhao R. Microvesicle-shuttled miR-130b reduces fat deposition in recipient primary cultured porcine adipocytes by inhibiting PPAR-g expression. *J Cell Physiol.* 2014;229(5):631-9.
160. Mizrak A, Bolukbasi MF, Ozdener GB, Brenner GJ, Madlener S, Erkan EP, et al. Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth. *Mol Ther.* 2013;21(1):101-8.

161. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011;29(4):341-5.
162. Pitt JM, Charrier M, Viaud S, Andre F, Besse B, Chaput N, et al. Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol.* 2014;193(3):1006-11.
163. Besse B, Charrier M, Lapiere V, Dansin E, Lantz O, Planchard D, et al. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology.* 2016;5(4):e1071008.
164. Jia S, Zhang R, Li Z, Li J. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor ADN, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(33):55632-45.
165. Zhang J, Quadri S, Wolfgang CL, Zheng L. New Development of Biomarkers for Gastrointestinal Cancers: From Neoplastic Cells to Tumor Microenvironment. *Biomedicines.* 2018;6(3).
166. Mahmoudi K, Ezrin A, Hadjipanayis C. Small extracellular vesicles as tumor biomarkers for glioblastoma. *Mol Aspects Med.* 2015;45:97-102.
167. Garcia-Romero N, Carrion-Navarro J, Esteban-Rubio S, Lazaro-Ibanez E, Peris-Celda M, Alonso MM, et al. ADN sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients. *Oncotarget.* 2017;8(1):1416-28.
168. Evans SM, Putt M, Yang XY, Lustig RA, Martinez-Lage M, Williams D, et al. Initial evidence that blood-borne microvesicles are biomarkers for recurrence and survival in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Neurooncol.* 2016;127(2):391-400.
169. Osti D, Del Bene M, Rappa G, Santos M, Matafora V, Richichi C, et al. Clinical Significance of Extracellular Vesicles in Plasma from Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res.* 2019;25(1):266-76.
170. Castellanos-Rizaldos E, Grimm DG, Tadigotla V, Hurley J, Healy J, Neal PL, et al. Exosome-Based Detection of EGFR T790M in Plasma from Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2018;24(12):2944-50.
171. Hur JY, Kim HJ, Lee JS, Choi CM, Lee JC, Jung MK, et al. Extracellular vesicle-derived ADN for performing EGFR genotyping of NSCLC patients. *Mol Cancer.* 2018;17(1):15.
172. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Trachtenberg AJ, Hochberg FH, Skog J, et al. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. *Front Physiol.* 2012;3:162.
173. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750.
174. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine.* 2011;7(6):780-8.
175. Ibanez de Caceres I, Dulaimi E, Hoffman AM, Al-Saleem T, Uzzo RG, Cairns P. Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer. *Cancer Res.* 2006;66(10):5021-8.
176. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
177. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure ADN methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(8):E32.
178. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-74.
179. Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS. Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. *Biometrics.* 2000;56(2):337-44.
180. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. FDA-NIH Biomarker Working Group. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2016. [
181. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* ADN polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(16):7276-80.
182. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Silva C, Oliveira J, Lopes C, et al. Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. *Urology.* 2002;60(6):1131-5.
183. Hartmann C, Hentschel B, Simon M, Westphal M, Schackert G, Tonn JC, et al. Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin Cancer Res.* 2013;19(18):5146-57.

184. Mickevicius NJ, Carle AB, Bluemel T, Santarriaga S, Schloemer F, Shumate D, et al. Location of brain tumor intersecting white matter tracts predicts patient prognosis. *J Neurooncol.* 2015;125(2):393-400.
185. Johannessen LE, Brandal P, Myklebust TA, Heim S, Micci F, Panagopoulos I. MGMT Gene Promoter Methylation Status - Assessment of Two Pyrosequencing Kits and Three Methylation-specific PCR Methods for their Predictive Capacity in Glioblastomas. *Cancer Genomics Proteomics.* 2018;15(6):437-46.
186. Preusser M, Berghoff AS, Manzl C, Filipits M, Weinhausel A, Pulverer W, et al. Clinical Neuropathology practice news 1-2014: pyrosequencing meets clinical and analytical performance criteria for routine testing of MGMT promoter methylation status in glioblastoma. *Clin Neuropathol.* 2014;33(1):6-14.
187. Brigliadori G, Foca F, Dall'Agata M, Rengucci C, Melegari E, Cerasoli S, et al. Defining the cutoff value of MGMT gene promoter methylation and its predictive capacity in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2016;128(2):333-9.
188. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-ADN methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res.* 2004;10(6):1871-4.
189. Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann RD, et al. Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *J Clin Oncol.* 2006;24(27):4412-7.
190. Clayton A, Boilard E, Buzas EI, Cheng L, Falcon-Perez JM, Gardiner C, et al. Considerations towards a roadmap for collection, handling and storage of blood extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1):1647027.
191. George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood.* 1982;60(4):834-40.
192. Palviainen M, Saraswat M, Varga Z, Kitka D, Neuvonen M, Puhka M, et al. Extracellular vesicles from human plasma and serum are carriers of extravesicular cargo-Implications for biomarker discovery. *PLoS One.* 2020;15(8):e0236439.
193. Jacques G, Cormac O. Central nervous system tumors. *Handb Clin Neurol.* 2013;112:931-58.
194. Leighl NB, Page RD, Raymond VM, Daniel DB, Divers SG, Reckamp KL, et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free ADN Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4691-700.
195. Gong M, Shi W, Qi J, Shao G, Shi Z, Wang J, et al. Alu hypomethylation and MGMT hypermethylation in serum as biomarkers of glioma. *Oncotarget.* 2017;8(44):76797-806.
196. Wang Z, Jiang W, Wang Y, Guo Y, Cong Z, Du F, et al. MGMT promoter methylation in serum and cerebrospinal fluid as a tumor-specific biomarker of glioma. *Biomed Rep.* 2015;3(4):543-8.
197. Lavon I, Refael M, Zelikovitch B, Shalom E, Siegal T. Serum ADN can define tumor-specific genetic and epigenetic markers in gliomas of various grades. *Neuro Oncol.* 2010;12(2):173-80.
198. Liu BL, Cheng JX, Zhang W, Zhang X, Wang R, Lin H, et al. Quantitative detection of multiple gene promoter hypermethylation in tumor tissue, serum, and cerebrospinal fluid predicts prognosis of malignant gliomas. *Neuro Oncol.* 2010;12(6):540-8.
199. Ricklefs FL, Maire CL, Reimer R, Duhrsen L, Kolbe K, Holz M, et al. Imaging flow cytometry facilitates multiparametric characterization of extracellular vesicles in malignant brain tumours. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1):1588555.
200. Gandham S, Su X, Wood J, Nocera AL, Alli SC, Milane L, et al. Technologies and Standardization in Research on Extracellular Vesicles. *Trends Biotechnol.* 2020;38(10):1066-98.
201. They C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;Chapter 3:Unit 3 22.
202. Karimi N, Cvjetkovic A, Jang SC, Crescitelli R, Hosseinpour Feizi MA, Nieuwland R, et al. Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(15):2873-86.
203. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature.* 2015;523(7559):177-82.
204. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.

205. Bernard V, Kim DU, San Lucas FA, Castillo J, Allenson K, Mulu FC, et al. Circulating Nucleic Acids Are Associated With Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*. 2019;156(1):108-18 e4.
206. Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, Ryan WL. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free ADN is localized in exosomes. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183915.
207. Zavridou M, Strati A, Bournakis E, Smilkou S, Tserpeli V, Lianidou E. Prognostic Significance of Gene Expression and ADN Methylation Markers in Circulating Tumor Cells and Paired Plasma Derived Exosomes in Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4).
208. Maire CL, Fuh MM, Kaulich K, Fita KD, Stevic I, Heiland DH, et al. Genome-wide methylation profiling of glioblastoma cell-derived extracellular vesicle ADN allows tumor classification. *Neuro Oncol*. 2021.
209. Capper D, Stichel D, Sahm F, Jones DTW, Schrimpf D, Sill M, et al. Practical implementation of ADN methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol*. 2018;136(2):181-210.
210. Bagley SJ, Nabavizadeh SA, Mays JJ, Till JE, Ware JB, Levy S, et al. Clinical Utility of Plasma Cell-Free ADN in Adult Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma: A Pilot Prospective Study. *Clin Cancer Res*. 2020;26(2):397-407.
211. Fontanilles M, Marguet F, Beaussire L, Magne N, Pepin LF, Alexandru C, et al. Cell-free ADN and circulating TERT promoter mutation for disease monitoring in newly-diagnosed glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):179.
212. Yekula A, Muralidharan K, Rosh ZS, Youngkin AE, Kang KM, Balaj L, et al. Liquid Biopsy Strategies to Distinguish Progression from Pseudoprogression and Radiation Necrosis in Glioblastomas. *Adv Biosyst*. 2020;4(12):e2000029.
213. Zachariah MA, Oliveira-Costa JP, Carter BS, Stott SL, Nahed BV. Blood-based biomarkers for the diagnosis and monitoring of gliomas. *Neuro Oncol*. 2018;20(9):1155-61.
214. Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, Mulholland P, Lim M, Wick A, et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(7):1003-10.
215. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462-77.

Anexos

ANEXOS

ANEXO I. Tabla de pacientes incluidos en este estudio.

ID	Edad	Sexo	Tipo de cirugía	RM PostQx	ECOG	Localización	% Met MGMT MSP	% Met MGMT qMSP	% Met MGMT ADNlc	% Met MGMT exoADN (plasma)	% Met MGMT exoADN (suero)
1	57	Mujer	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo parietal	NM	66,6			
2	71	Hombre	Biopsia	Restos	2	Varios lóbulos	NM	0,0			
3	46	Hombre	Resección incompleta	Restos	0	Lóbulo temporal	M	65,0			
4	45	Hombre	Resección incompleta	Restos	0	Lóbulo temporal	NM	0,0			
5	55	Hombre	Resección incompleta	Posibles restos	0	Lóbulo frontal	NM	0,0			
6	72	Hombre	Resección completa	Sin restos	0	Varios lóbulos	NM	1,6			
7	62	Mujer	Resección completa		0	Lóbulo frontal	M	60,3			
8	48	Mujer	Resección completa	Sin restos	0	Lóbulo frontal	M	66,0			
9	78	Mujer	Biopsia		3	Lóbulo temporal	NM	0,0			
10	50	Hombre	Biopsia	Restos	0	Varios lóbulos	NM	0,0			
11	70	Mujer	Resección incompleta	Posibles restos	2	Lóbulo frontal	M	5,9			
12	68	Hombre	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo temporal	NM	0,0			
13	65	Mujer	Resección completa	Posibles restos	0	Varios lóbulos	NM	0,0			
14	81	Mujer	Resección completa	Sin restos	0	Lóbulo parietal	NM	0,0			
15	66	Mujer	Resección incompleta	Restos	0	Lóbulo temporal	NM	0,0			
16	66	Mujer	Biopsia	Restos	1	Lóbulo frontal	NM	0,0			
17	82	Mujer	Biopsia	Restos	0	Lóbulo frontal	NM	0,0			
18	73	Hombre	Resección incompleta	Restos	0	Varios lóbulos	M	97,5			
19	55	Hombre	Resección incompleta	Sin restos	3	Ínsula	NM	0,0			
20	52	Hombre	Resección completa	Sin restos	0	Lóbulo parietal	NM	0,0			
21	50	Hombre	Resección completa	Restos	3	Lóbulo frontal	NM	0,0			
22	80	Mujer	Resección completa	Sin restos	2	Lóbulo frontal	M	99,9			
23	56	Mujer	Resección incompleta	Sin restos	1	Lóbulo frontal	NM	0,0			
24	64	Hombre	Resección completa	Restos	0	Varios lóbulos	M	27,5			
25	50	Hombre	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo occipital	M	94,1			
26	62	Mujer	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo parietal	M	97,6			
27	56	Hombre	Resección incompleta	Restos	0	Varios lóbulos	NM	0,0			
28	65	Hombre	Resección incompleta	Sin restos	0	Lóbulo frontal	NM	64,6			
29	59	Hombre	Resección incompleta	Restos	0	Varios lóbulos	NM	0,0			

30	72	Mujer	Resección completa	Sin restos	0	Varios lóbulos	NM	0,0			
31	77	Mujer	Resección completa	Sin restos	0	Lóbulo parietal	M	17,8			
32	73	Mujer	Resección completa	Posibles restos	0	Varios lóbulos	M	83,0			
33	68	Hombre	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo temporal	NM	0,0	0,0		
34	61	Hombre	Resección completa	Sin restos	0	Lóbulo frontal	NM	0,0			
35	51	Mujer	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo temporal	M	36,0			
36	55	Hombre	Resección completa	Sin restos	0	Lóbulo temporal	M	96,4			
37	63	Hombre	Biopsia	Restos	0	Varios lóbulos	NM	0,0	0,0		
38	77	Mujer	Biopsia		0	Lóbulo frontal	M	100,0	0,0		
39	77	Mujer	Resección completa	Posibles restos	1	Varios lóbulos	NM	0,0			
40	85	Hombre	Biopsia		0	Lóbulo parietal	NM	0,0	0,0		
41	76	Hombre	Resección completa	Restos	1	Lóbulo parietal	M	100,0			
42	47	Hombre	Resección completa	Restos	0	Lóbulo parietal	NM	0,0			
43	56	Mujer	Resección incompleta	Restos	2	Lóbulo frontal	NM	0,0			
44	81	Mujer	Resección incompleta	Restos	1	Varios lóbulos	NM	0,0	0,0		
45	30	Hombre	Biopsia		0	Lóbulo frontal	M	77,0	1,5	90,6	
46	57	Hombre	Biopsia	Biopsia	1	Tálamo	NM	0,0			
47	61	Hombre	Resección completa	Restos	1	Varios lóbulos	NM	0,0			
48	73	Hombre	Resección completa	Restos	0	Lóbulo frontal	M	92,6	0,0	0,0	
49	49	Mujer	Resección incompleta	Sin restos	1	Lóbulo temporal	M	100,0	0,0		
50	67	Hombre	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo temporal	NM	0,0	0,0	0,0	
51	71	Hombre	Resección incompleta	Posibles restos	0	Lóbulo frontal	NM	0,0			
52	83	Hombre	Biopsia	Biopsia	3	Lóbulo frontal	M	99,9	0,0	88,0	
53	53	Mujer	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo parietal	NM	0,0	0,0	0,0	
54	54	Mujer	Resección completa	Restos	0	Varios lóbulos	M	100,0			
55	69	Mujer	Biopsia		2	Varios lóbulos	NM	0,0			
56	61	Hombre	Resección completa	Sin restos	0	Lóbulo frontal	NM	0,0		0,0	
57	55	Hombre	Resección incompleta	Restos	0	Lóbulo frontal	NM	0,0			
58	65	Hombre	Resección incompleta		0	Lóbulo temporal	NM	0,0	0,0	0,0	
59	76	Mujer	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo parietal	M	88,9			
60	69	Mujer	Resección incompleta	Restos	1	Lóbulo occipital	NM	0,0	0,0	0,0	
61	73	Mujer	Resección incompleta	Posibles restos	1	Lóbulo occipital	NM	0,0	0,0	0,0	
62	52	Hombre	Resección completa	Restos	1	Lóbulo parietal	NM	0,0	0,0	0,0	
63	38	Hombre	Resección completa	Posibles restos	1	Varios lóbulos	M	100,0		76,5	
64	70	Hombre	Biopsia	Biopsia	0	Lóbulo frontal	NM	0,0			

65	72	Hombre	Resección completa	Sin restos	0	Varios lóbulos	M	100,0		0,0	
66	68	Mujer	Resección completa	Posibles restos	1	Varios lóbulos	NM	0,0	0,0	0,0	
67	51	Hombre	Resección completa	Sin restos	2	Lóbulo frontal	M	99,9			
68	51	Hombre	Resección completa	Restos	0	Lóbulo frontal	NM	0,0			
69	58	Mujer	Biopsia		0	Varios lóbulos	NM	0,0	0,0	88,4	
70	50	Mujer	Resección completa		0	Lóbulo frontal	NM	0,4	0,0	0,00	
71	62	Hombre	Resección completa	Restos	1	Lóbulo frontal	NM	0,0			
72	57	Hombre	Biopsia	Sin restos	0	Tálamo	NM	0,0			
73	74	Hombre	Resección completa	Sin restos	1	Varios lóbulos	NM	0,0			
74	50	Hombre	Resección completa		0	Lóbulo occipital	NM	0,0		0,0	
75	64	Mujer	Resección incompleta	Restos	1	Lóbulo parietal	NM	13,0			
76	61	Hombre	Resección incompleta	Sin restos	0	Lóbulo occipital	NM	81,0			
77	72	Hombre	Resección completa	Restos	0	Varios lóbulos	NM	0,0			
78	66	Hombre	Resección completa	Posibles restos	2	Lóbulo frontal	NM	99,9			
79	65	Hombre	Resección completa	Sin restos	0	Lóbulo occipital	NM	0,0		0,0	
80	41	Mujer	Resección incompleta	Restos	0	Varios lóbulos	NM	0,0		0,0	
81	80	Hombre	Resección completa	Sin restos	1	Lóbulo frontal	NM	0,0		0,0	
82	45	Mujer	Resección completa	Restos	2	Lóbulo frontal	M	100,0		0,0	
83	52	Hombre	Resección completa	Sin restos	1	Lóbulo parietal	M	48,6		0,0	
84	63	Hombre	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo temporal	NM	0,0		0,0	
85	63	Hombre	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo parietal	NM	0,0		0,0	
86	63	Mujer	Resección incompleta	Posibles restos	0	Lóbulo temporal	NM	0,0		0,0	
87	72	Mujer	Biopsia	Biopsia	1	Lóbulo parietal	NM	0,0		0,0	0,0
88	67	Hombre	Resección completa	Sin restos	1	Lóbulo frontal	NM	0,0		0,0	0,0
89	58	Hombre	Biopsia	Sin restos	0	Varios lóbulos	NM	35,0			
90	70	Hombre	Resección incompleta	Posibles restos	1	Lóbulo temporal	M	94,4		0,00	
91	67	Mujer	Biopsia		1	Cuerpo calloso	NM	6,9		99,2	0,0
92	59	Hombre	Resección incompleta	Restos	0	Lóbulo frontal	NM	0,0			
93	58	Mujer	Resección completa	Sin restos	2	Lóbulo temporal	NM	0,0		0,0	
94	53	Hombre	Resección incompleta	Sin restos	0	Lóbulo frontal	NM	0,0			
95	50	Hombre	Resección incompleta	Restos	1	Varios lóbulos	M	87,8			
96	60	Mujer	Resección incompleta	Sin restos	2	Varios lóbulos	M	91,3		92,9	0,0
97	59	Hombre	Biopsia	Biopsia	2	Varios lóbulos	NM	0,0			
98	75	Mujer	Resección incompleta	Posibles restos	1	Lóbulo parietal	M	47,9		83,6	7,4

99	26	Mujer	Biopsia		3	Lóbulo frontal	NM	0,0			
100	58	Mujer	Resección completa	Posibles restos	1	Lóbulo temporal	NM	100,0			
101	42	Mujer	Resección incompleta	Sin restos	0	Lóbulo frontal		0,0	0,0	0,0	
102	71	Hombre	Resección incompleta	Posibles restos	3	Lóbulo frontal		0,0		0,0	
103	52	Mujer	Resección completa	Posibles restos	1	Lóbulo occipital		47,4		40,6	0,0
104	56	Mujer	Resección incompleta	Restos	2	Varios lóbulos		0,0		0,0	
105	70	Hombre	Resección incompleta	Restos	2	Lóbulo temporal		0,0		0,0	
106	61	Hombre	Resección completa	Sin restos	0	Lóbulo frontal		0,0		0,0	
107	71	Mujer	Resección incompleta	Restos	1	Lóbulo parietal		81,2		95,0	
108	72	Hombre	Resección completa	Posibles restos	1	Lóbulo occipital		0,0		0,0	
109	39	Hombre	Resección incompleta	Restos	0	Lóbulo temporal		0,0		0,0	
110	77	Mujer	Resección completa	Restos	0	Lóbulo frontal		0,0		0,0	
111	61	Hombre	Resección completa	Posibles restos		Lóbulo parietal		99,5			
112	82	Hombre	Resección incompleta	Restos	0	Varios lóbulos		0,0		0,0	
113	61	Hombre	Resección incompleta	Posibles restos		Lóbulo temporal		80,0			
114	66	Mujer	Biopsia	Restos	1	Lóbulo frontal					
115	79	Hombre	Resección completa	Posibles restos	0	Lóbulo parietal		11,8		0,0	
116	77	Hombre	Resección completa	Sin restos	0	Varios lóbulos		85,8		0,0	
117	71	Hombre	Resección completa	Posibles restos	1	Varios lóbulos		37,4		0,0	
118	51	Mujer	No cirugía	Restos	3	Varios lóbulos				97,6	
119	67	Mujer	Biopsia	Restos	2	Lóbulo frontal				0	
120	71	Hombre	Biopsia	Restos		Varios lóbulos				0	
121	59	Hombre	Resección incompleta	Restos	0	Lóbulo frontal		0,0			0,0
122	48	Hombre	Biopsia	Restos		Hipotálamo				0	
123	58	Mujer	Resección completa	Posibles restos	1	Lóbulo temporal		100,0		87,4	0,0
124	63	Mujer	Biopsia	Restos		Lóbulo frontal		73,2	13,3		
125	61	Hombre	Resección completa	Sin restos	1	Varios lóbulos		100,0		7,6	

ANEXO II. Artículos relacionados con la tesis.

- *Clinical validation of a novel quantitative assay for the detection of MGMT methylation in glioblastoma patients.* **Rosas-Alonso R**, Colmenarejo-Fernandez J, Pernia O, Rodriguez-Antolín C, Esteban I, Ghanem I, Sanchez-Cabrero D, Losantos-Garcia I, Palacios-Zambrano S, Moreno-Bueno G, de Castro J, Martinez-Marin V, Ibanez-de-Caceres I. Clin Epigenetics. 2021 Mar 9;13(1):52. doi: 10.1186/s13148-021-01044-2.
- *Clinical use of MGMT methylation in liquid biopsy as a tool for glioma patient management.* **Rosas-Alonso R et al.** Manuscrito en preparación.

ANEXO III. Artículos no relacionados con la tesis.

- *Novel SLC12A2-ROS1 Fusion in Non-Small Cell Lung Cancer with a Significant Response to Crizotinib: The Importance of Choosing the Appropriate Next-Generation Sequencing Assay.* Rodríguez-Antolín C, **Rosas-Alonso R**, Cruz P, Higuera O, Sánchez-Cabrero D, Esteban-Rodríguez I, Peláez-García A, Fernández Montaña VE, Rodríguez-Jiménez C, Ibáñez de Cáceres I, de Castro J. *Oncologist*. 2021 Mar 8. doi: 10.1002/onco.13745.
- *Symptomatic heterozygous X-Linked myotubular myopathy female patient with a large deletion at Xq28 and decrease expression of normal allele.* Gómez-González C, Rosas-Alonso R, Rodríguez-Antolín C, García-Guede A, Ibáñez de Cáceres I, Sanguino J, Pascual SI, Esteban I, Pozo AD, Mori MÁ, Torres RJ, Prior C. *Eur J Med Genet*. 2021 Apr;64(4):104170. doi: 10.1016/j.ejmg.2021.104170.
- *Hypermethylation of Anti-oncogenic MicroRNA 7 is Increased in Emphysema Patients.* **Rosas-Alonso R**, Galera R, Sánchez-Pascuala JJ, Casitas R, Burdiel M, Martínez-Cerón E, Vera O, Rodríguez-Antolín C, Pernía O, De Castro J, García-Río F, Ibanez-de-Cáceres I. *Arch Bronconeumol*. 2020 Aug;56(8):506-513. doi: 10.1016/j.arbres.2019.10.017.
- *A Novel Role for the Tumor Suppressor Gene ITF2 in Tumorigenesis and Chemotherapy Response.* Pernía O, Sastre-Perona A, Rodríguez-Antolín C, García-Guede A, Palomares-Bralo M, **Rosas R**, Sánchez-Cabrero D, Cruz P, Rodríguez C, Diestro M, Martín-Arenas R, Pulido V, Santisteban P, Castro J, Vera O, Ibáñez de Cáceres I. *Cancers (Basel)*. 2020 Mar 26;12(4):786. doi: 10.3390/cancers12040786.
- *miR-7 methylation as a biomarker to predict poor survival in early-stage non-small cell lung cancer patients.* Rodríguez-Antolín C, Felguera-Selas L, Pernía O, Vera O, Esteban I, Losantos García I, de Castro J, **Rosas-Alonso R**, Ibanez de Cáceres I. *Cell Biosci*. 2019 Aug 7;9:63. doi: 10.1186/s13578-019-0326-7.
- *MAFG is a potential therapeutic target to restore chemosensitivity in cisplatin-resistant cancer cells by increasing reactive oxygen species.* Vera-Puente O, Rodríguez-Antolín C, Salgado-Figueroa A, Michalska P, Pernía O, Reid BM, **Rosas R**, García-Guede A, Sacristán S, Jiménez J, Esteban-Rodríguez I, Martín ME, Sellers TA, León R, González VM, De Castro J, Ibanez de Cáceres I. *Transl Res*. 2018 Oct;200:1-17. doi: 10.1016/j.trsl.2018.06.005



Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	300315510	
Application number	EP19382299.6	
File No. to be used for priority declarations	EP19382299	
Date of receipt	16 April 2019	
Your reference	904 072	
Applicant	Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP)	
Country	ES	
Title	METHOD FOR DETERMINING THE PERCENTAGE OF METHYLATION OF THE PROMOTER OF THE GENE O6-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE (MGMT) IN CIRCULATING EXOSOMES	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml OLF-ARCHIVE.zip\904 072 Final application.zip f1002-1.pdf (2 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECNONEPO.pdf904 072 Final application Spanish.pdf (24 p.)
Submitted by	CN=Gustavo Fuster 26814	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	16 April 2019, 16:45:02 (CEST)	
Official Digest of Submission	30:06:2F:4A:2E:26:ED:50:25:44:E0:B4:46:80:18:30:92:6B:FD:B3	

RESEARCH

Open Access



Clinical validation of a novel quantitative assay for the detection of *MGMT* methylation in glioblastoma patients

Rocio Rosas-Alonso^{1,2*}, Julian Colmenarejo-Fernandez^{1,2}, Olga Pernia^{1,2}, Carlos Rodriguez-Antolín^{1,2}, Isabel Esteban^{2,3}, Ismael Ghanem⁴, Dario Sanchez-Cabrero², Itsaso Losantos-Garcia⁵, Sara Palacios-Zambrano⁶, Gema Moreno-Bueno^{6,7,8}, Javier de Castro^{2,4}, Virginia Martinez-Marin⁴ and Inmaculada Ibanez-de-Caceres^{1,2*} 

Abstract

Background: The promoter hypermethylation of the methylguanine-DNA methyltransferase gene is a frequently used biomarker in daily clinical practice as it is associated with a favorable prognosis in glioblastoma patients treated with temozolamide. Due to the absence of adequately standardized techniques, international harmonization of the *MGMT* methylation biomarker is still an unmet clinical need for the diagnosis and treatment of glioblastoma patients.

Results: In this study we carried out a clinical validation of a quantitative assay for *MGMT* methylation detection by comparing a novel quantitative MSP using double-probe (dp_qMSP) with the conventional MSP in 100 FFPE glioblastoma samples. We performed both technologies and established the best cutoff for the identification of positive-methylated samples using the quantitative data obtained from dp_qMSP. Kaplan–Meier curves and ROC time dependent curves were employed for the comparison of both methodologies.

Conclusions: We obtained similar results using both assays in the same cohort of patients, in terms of progression free survival and overall survival according to Kaplan–Meier curves. In addition, the results of ROC(t) curves showed that dp_qMSP increases the area under curve time-dependent in comparison with MSP for predicting progression free survival and overall survival over time. We concluded that dp_qMSP is an alternative methodology compatible with the results obtained with the conventional MSP. Our assay will improve the therapeutic management of glioblastoma patients, being a more sensitive and competitive alternative methodology that ensures the standardization of the *MGMT*-biomarker making it reliable and suitable for clinical use.

Keywords: *MGMT* methylation, MSP, Dp_qMSP, Glioblastoma

Background

Epigenetic modifications are a hallmark of human cancers. The reduction of tumor-associated methylation levels which is associated with genomic instability was

one of the first epigenetic alterations to be described [1]. However, there are some areas of the genome that increase their methylation levels, which normally correspond with CpG islands of tumor suppressor genes [2–4]. DNA methylation is catalyzed by DNA methyltransferases, which transfer methyl groups from S-adenosylmethionine on CpG dinucleotides at the 5' carbon position of cytosines located at CpG islands. Methyl groups are recognized by Methyl-CpG-binding domain proteins, which interfere with the binding of transcriptional activators of DNA [5].

*Correspondence: rocio.rosas@salud.madrid.org; inma.ibanezca@salud.madrid.org

¹ Epigenetics Laboratory. INGEMM, Paseo La Castellana 261. Edificio Bloque Quirúrgico Planta -2. University Hospital La Paz, 28046 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

The methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene promoter hypermethylation is one of the most studied molecular biomarkers in neuro-oncology. *MGMT* gene encodes a repair enzyme that removes alkyl groups from the O⁶ position of guanine and works by antagonizing the cytotoxic effects of alkylating agents [6]. Promoter methylation is the main way of silencing the *MGMT* gene and predicts a favorable outcome in glioblastoma patients treated with alkylating drugs. Glioblastoma (GBM) is the most common primary malignant central nervous system tumor in adults and is invariably associated with poor prognosis. Only 33% of patients survive one year and only 5% of patients live more than five years after diagnosis [7–9]. Thus, the methylation status of *MGMT* is frequently used in the daily clinical routine as a predictive biomarker to classify GBM patients who are more likely to respond to temozolamide.

The *MGMT* CpG island has 98 CpG sites located on chromosome 10q26 that controls the *MGMT* gene expression. Malley et al. defined a differentially methylated region (DMR2) essential for silencing the *MGMT* gene. Most of the assays are based on the analysis of the CpG sites 73 to 90 located at the DMR2 area. Throughout this area, the CpGs 83, 86, 87 and 89 have been the best targets for methylation testing [10]. Furthermore, Bady et al. described two CpG sites in the *MGMT* promoter (cg12434587, chr10:131,265,209–131,265,210 and cg12981137, chr10:131,265,575–131,265,576) that showed the strongest association with overall survival (OS), being cg12981137 the CpG number 84 in the DMR2 area, and supporting the idea proposed by Malley et al. [11].

A wide range of molecular assays are available for qualitative and quantitative *MGMT* methylation detection. The most commonly used methods are based on bisulfite conversion of unmethylated cytosines into uracil [12]. Examples of methods include methylation-specific PCR (MSP) [6, 13, 14], pyrosequencing [13–15], different variations of real-time PCR [14, 16], digital PCR [17], methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) [13, 18], methylation-specific high-resolution melting (HRM) [19], and combined bisulfite restriction analysis (COBRA) [20]. Other techniques that can evaluate global methylation changes such as next-generation sequencing are currently employed in the field of research but not in the routine clinical practice [21]. Currently, MSP and pyrosequencing are the most widely used technical approaches to *MGMT* methylation analysis, providing information that is useful for clinical decision-making. However, the analytical sensitivity differs considerably among diverse assays and their standardization across a wide range of diagnostic laboratories is lacking [22, 23]. In fact, there is still a lack

of consensus on how to interpret the pyrosequencing data [14, 15]. In addition to the method used, other factors such as tumor content, contamination of inflammatory and stromal cells, necrosis, and tumor heterogeneity could affect the methylation results obtained [24].

Due to the increasing interest in molecular biomarkers and their impact in therapeutic management of glioblastoma patients, more sensitive and competitive alternative methodologies are in demand. In this study, we have developed an innovative quantitative methylation specific PCR (dp_qMSP) assay used for the study of *MGMT* methylation and validated its clinical use by comparing this novel assay with the conventional MSP.

Results

Clinical data

From May 2014 to March 2020, we enrolled 100 patients with newly diagnosed GBM. Among the 100 patients, 42 were women and 58 were men. The average age at diagnosis was 61 years old (age range 24–83 years).

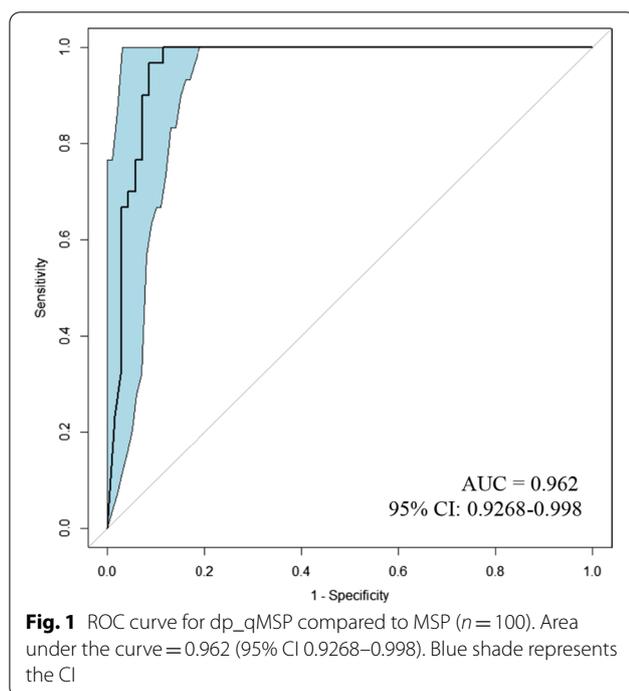
No significant differences were found between patients' age, sex, type of surgery, ECOG and *MGMT* promoter methylation assessed with MSP or dp_qMSP. Relevant clinical data of patients are described in Table 1.

Comparison between dp_qMSP and MSP methods for *MGMT* promoter methylation detection

ROC curve was performed to determine the cutoff for dp_qMSP. The area under the curve (AUC) was 0.962 (95% CI 0.927–0.998) (Fig. 1). The methylation cutoff point was established in 3.75% and was obtained by the formula previously described [25]. Thus, the samples were classified as methylated when the methylation was above the cutoff point of 3.75% and unmethylated when they were less than 3.75%. The sensitivity and specificity for this cutoff point were 100% (95% CI 88.6–100) and 88.6% (95% CI 79.0–94.1), respectively. *MGMT* methylation was detected in 30 out of 100 FFPE samples by MSP and 38 out of 100 samples by dp_qMSP (Table 2); a representative gel and quantitative amplifications are shown in Fig. 2 (see the uncropped gel at Additional file 1: Fig. 1). We obtained discrepancies in eight samples within both technologies, two of these eight patients present a survival in the mean value of patients harboring a methylated promoter (> 18 months) (Patients number 1; 23.4 months and patient number 76; 21.6 months). Patients number 75 and 100 were alive at their last following-up at our hospital, although unfortunately we lost their follow-up because they changed hospitals. Patients number 28 and 78, with median survival of 8.3 months with a incomplete tumor resection and 12,6 months with complete resection, respectively present a standard overall survival in this pathology and the last two patients (numbers 89;

Table 1 Demographic and clinical data of the study population ($n = 100$)

Characteristic	Value	Methylation status MSP	Methylation status dp_qMSP	MSP (p value)	dp_qMSP (p value)
Average age at surgery and range	61 (25–84)			$p = 0.632$	$p = 0.697$
Sex					
Women	42	15 methylated 27 unmethylated	19 methylated 23 unmethylated	$p = 0.377$	$p = 0.218$
Men	58	15 methylated 43 unmethylated	19 methylated 39 unmethylated		
Type of surgery					
Total resection	51	19 methylated 32 unmethylated	22 methylated 29 unmethylated	$p = 0.174$	$p = 0.367$
Partial resection	29	8 methylated 21 unmethylated	11 methylated 18 unmethylated		
Biopsy	20	3 methylated 17 unmethylated	5 methylated 15 unmethylated		
ECOG					
0	59	17 methylated 42 unmethylated	21 methylated 38 unmethylated	$p = 0.727$	$p = 0.624$
1	24	7 methylated 17 unmethylated	10 methylated 14 unmethylated		
2	12	5 methylated 7 unmethylated	6 methylated 6 unmethylated		
3	5	1 methylated 4 unmethylated	1 methylated 4 unmethylated		



4.5 months and 91; 4.8 months) with the worst survival, were diagnosed with biopsy and they did not underwent a complete resection. The results from those samples by

MSP and dp_qMSP together with sample number 11 that presents the lowest percentage of methylation by using dp_qMSP are shown in Additional file 2: Supplementary Fig. 2. If we consider the eight positives identified by dp_qMSP to be false positives based on the data obtained using MSP, the specificity achieved by dp_qMSP would be 88.6%. Additionally, we considered of great interest to probe the presence of methylated DNA molecules in these samples, and in fact, in collaboration with the Md Anderson hospital, they were able to amplify 5 of these samples using an alternative MSP technique with different settings and DNA modification procedures (deeply described in Additional file 3: supplementary Fig. 3) and found a very weak amplification at the methylated reaction in three of the samples, 1, 78 and 100. In none of the three cases, this amplification would have suggested the diagnosis of a methylated sample for the *MGMT* marker, as it happens with our results using MSP technology, but supports our positive results obtained by dp_qMSP, as these three samples out of the five, are the ones with the highest percentage of methylation when were analysed by dp_qMSP in our laboratory.

Examination dp_qMSP and MSP methods for survival analysis

The multivariable COX regression survival analysis identified significant differences for the variables MSP

Table 2 Clinical, pathological and methylation data of 100 GBM patients

ID	Age	Sex	Type of surgery	ECOG	MSP	%Methylation dp_qMSP
1	57	Female	Total resection	0	U	66,6
2	70	Male	Biopsy	2	U	0
3	45	Male	Partial resection	0	M	65
4	44	Male	Partial resection	0	U	0
5	54	Male	Partial resection	0	U	0
6	71	Male	Total resection	0	U	1,6
7	61	Female	Total resection	0	M	60,3
8	47	Female	Total resection	0	M	66
9	77	Female	Biopsy	3	U	0
10	49	Male	Biopsy	0	U	0
11	69	Female	Partial resection	2	M	5,9
12	67	Male	Total resection	0	U	0
13	65	Female	Total resection	0	U	0
14	80	Female	Total resection	0	U	0
15	66	Female	Partial resection	0	U	0
16	65	Female	Biopsy	1	U	0
17	81	Female	Biopsy	0	U	0
18	72	Male	Partial resection	0	M	97,5
19	54	Male	Partial resection	3	U	0
20	51	Male	Total resection	0	U	0
21	49	Male	Total resection	3	U	0
22	79	Female	Total resection	2	M	99,9
23	55	Female	Partial resection	1	U	0
24	64	Male	Total resection	0	M	27,5
25	49	Male	Total resection	0	M	94,1
26	62	Female	Total resection	0	M	97,6
27	55	Male	Partial resection	0	U	0
28	65	Male	Partial resection	0	U	64,6
29	58	Male	Partial resection	0	U	0
30	71	Female	Total resection	0	U	0
31	76	Female	Total resection	0	M	17,8
32	73	Female	Total resection	0	M	83
33	67	Male	Total resection	0	U	0
34	60	Male	Total resection	0	U	0
35	50	Female	Total resection	0	M	36
36	54	Male	Total resection	0	M	96,4
37	62	Male	Biopsy	0	U	0
38	76	Female	Biopsy	0	M	100
39	76	Female	Total resection	1	U	0
40	84	Male	Biopsy	0	U	0
41	75	Male	Total resection	1	M	100
42	46	Male	Total resection	0	U	0
43	55	Female	Partial resection	2	U	0
44	80	Female	Partial resection	1	U	0
45	29	Male	Biopsy	0	M	77
46	56	Male	Biopsy	1	U	0
47	61	Male	Total resection	1	U	0
48	72	Male	Total resection	0	M	92,6
49	48	Female	Partial resection	1	M	100

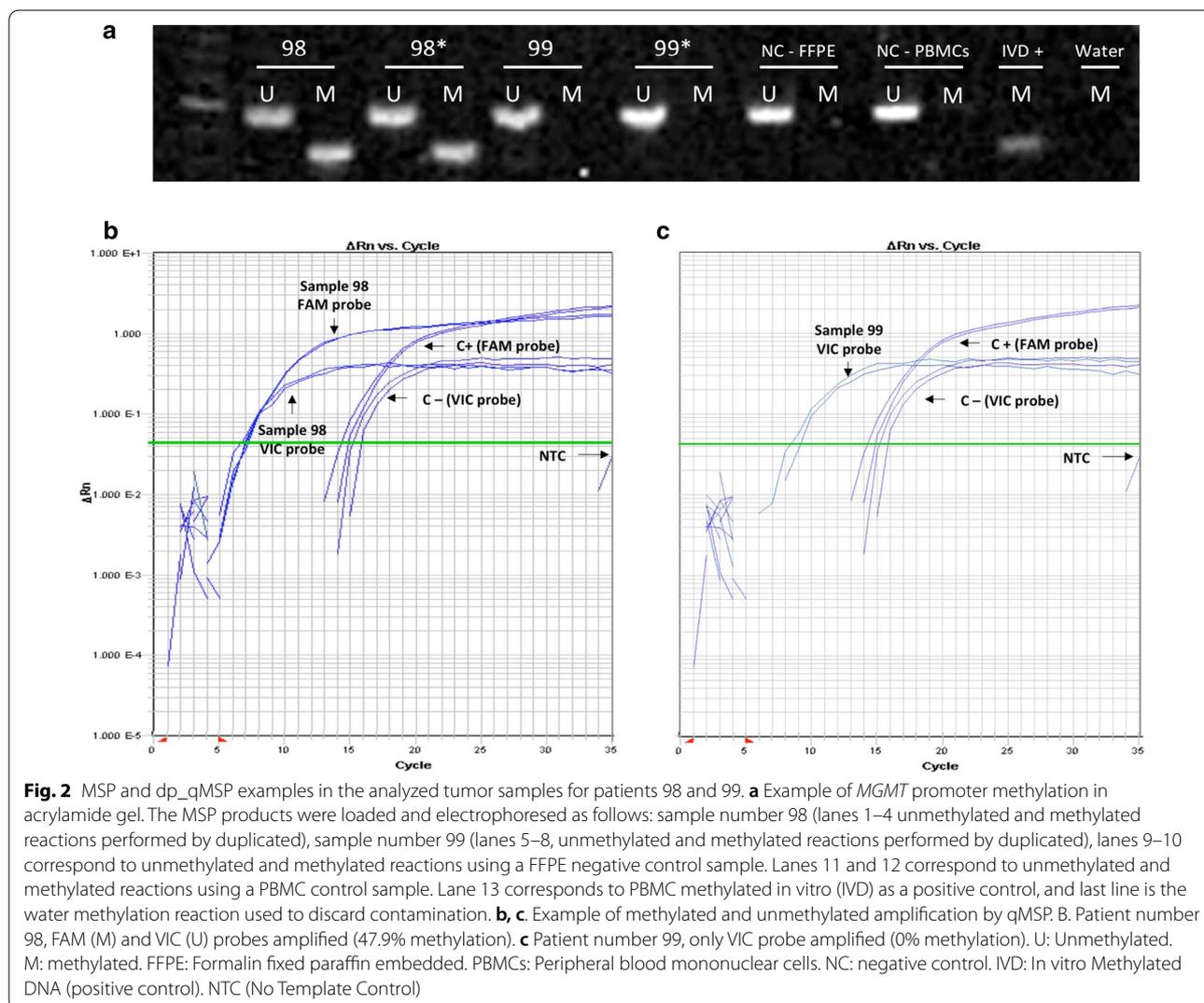
Table 2 (continued)

ID	Age	Sex	Type of surgery	ECOG	MSP	%Methylation dp_qMSP
50	66	Male	Total resection	0	U	0
51	70	Male	Partial resection	0	U	0
52	82	Male	Biopsy	3	M	99,9
53	52	Female	Total resection	0	U	0
54	54	Female	Total resection	0	M	100
55	68	Female	Biopsy	2	U	0
56	60	Male	Total resection	0	U	0
57	54	Male	Partial resection	0	U	0
58	64	Male	Partial resection	0	U	0
59	75	Female	Total resection	0	M	88,89
60	68	Female	Partial resection	1	U	0
61	73	Female	Partial resection	1	U	0
62	51	Male	Total resection	1	U	0
63	37	Male	Total resection	1	M	100
64	69	Male	Biopsy	0	U	0
65	71	Male	Total resection	0	M	100
66	67	Female	Total resection	1	U	0
67	51	Male	Total resection	2	M	99,9
68	50	Male	Total resection	0	U	0
69	57	Female	Biopsy	0	U	0
70	50	Female	Total resection	0	U	0,4
71	61	Male	Total resection	1	U	0
72	56	Male	Biopsy	0	U	0
73	73	Male	Total resection	2	U	0
74	49	Male	Total resection	0	U	0
75	63	Female	Partial resection	1	U	53,1
76	60	Male	Partial resection	0	U	81
77	71	Male	Total resection	0	U	0
78	65	Male	Total resection	2	U	99,9
79	64	Male	Total resection	0	U	0
80	40	Female	Partial resection	0	U	0
81	79	Male	Total resection	1	U	0
82	44	Female	Total resection	2	M	100
83	51	Male	Total resection	1	M	48,6
84	62	Male	Total resection	0	U	0
85	62	Male	Total resection	0	U	0
86	62	Female	Partial resection	0	U	0
87	71	Female	Biopsy	1	U	0
88	66	Male	Total resection	1	U	0
89	57	Male	Biopsy	0	U	35
90	69	Male	Partial resection	1	M	94,4
91	67	Female	Biopsy	1	U	6,9
92	59	Male	Partial resection	0	U	0
93	57	Female	Total resection	2	U	0
94	52	Male	Partial resection	0	U	0
95	50	Male	Partial resection	1	M	87,8
96	60	Female	Partial resection	2	M	91,3
97	58	Male	Biopsy	2	U	0
98	74	Female	Partial resection	1	M	47,9

Table 2 (continued)

ID	Age	Sex	Type of surgery	ECOG	MSP	%Methylation dp_qMSP
99	25	Female	Biopsy	3	U	0
100	57	Female	Total resection	1	U	100

Age (years), M (methylated MGMT), U (unmethylated MGMT)



and dp_qMSP for both PFS ($p=0.001$ and $p=0.004$) and overall survival ($p=0.008$ and $p=0.036$) respectively; while no significant differences were found for the clinical variables (type of surgery, age, sex and ECOG). Therefore, we proceeded to study these variables using a univariate model. The median of OS measured by MSP in the group of patients with unmethylated *MGMT* promoter in our cohort was 11.8 months (95% CI 10.4–13.2) while the median of OS was not reached in the

methylated group (Fig. 3a). We observed significant differences between unmethylated and methylated groups in terms of OS ($p=0.004$, HR=0.37, 95% CI 0.19–0.72). The rate of OS at two years was only 17% in the unmethylated group compared with the 53% observed in the methylated group. The median PFS was 7.0 months (95% CI 5.3–8.8) in the unmethylated MSP group and 18.0 months (95% CI 9.8–26.1) in the methylated MSP group (Fig. 3b). We also observed significant differences

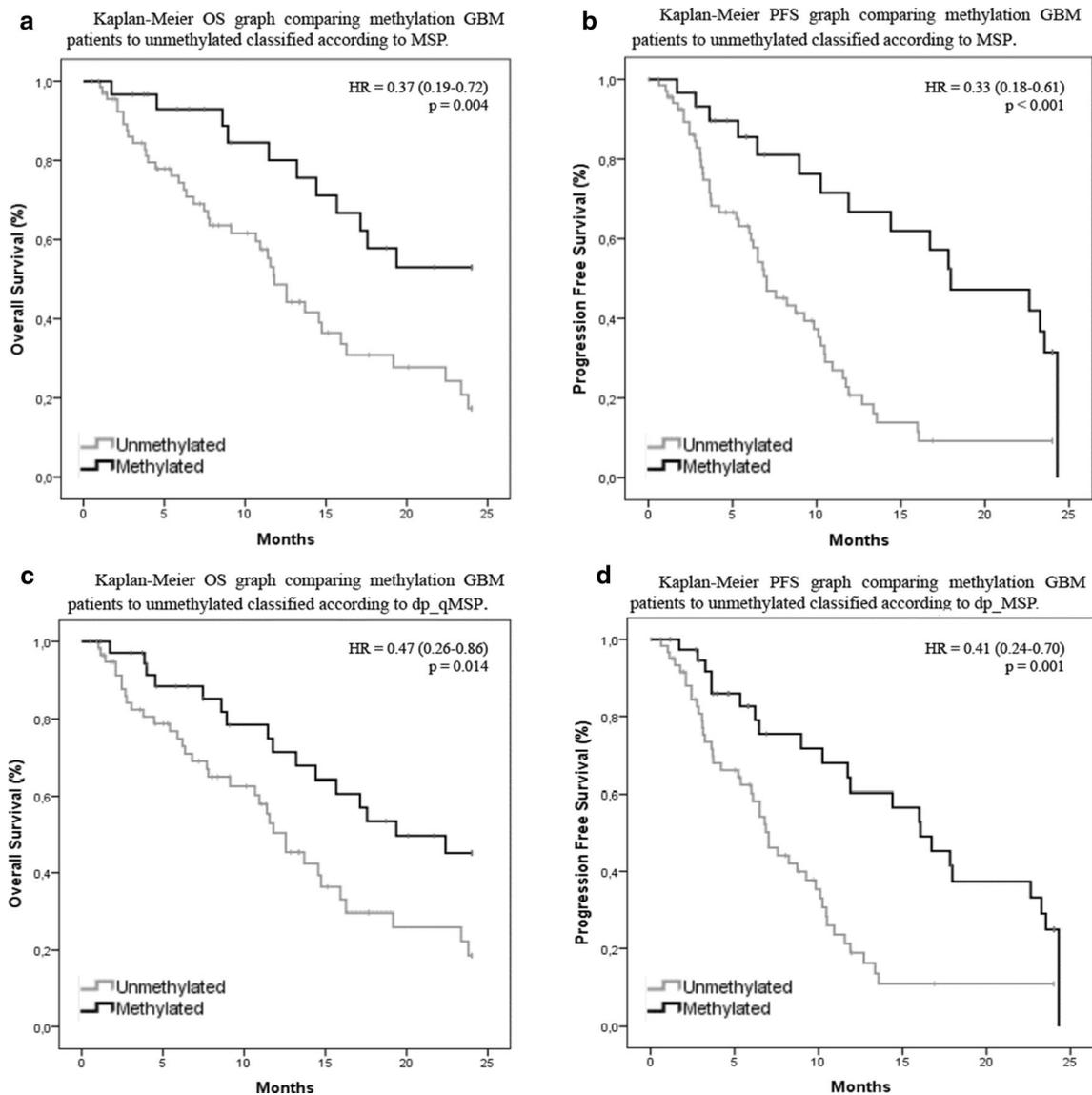


Fig. 3 Survival analysis of GBM patients. **a** Kaplan–Meier OS graph comparing methylation GBM patients to unmethylated classified according to MSP. **b** Kaplan–Meier PFS graph comparing methylation GBM patients to unmethylated classified according to MSP. **c** Kaplan–Meier OS graph comparing methylation GBM patients to unmethylated classified according to dp_qMSP. **d** Kaplan–Meier PFS graph comparing methylation GBM patients to unmethylated classified according to MSP

in terms of PFS regarding the methylation status between groups ($p < 0.001$, HR = 0.33, 95% CI 0.18–0.61). The rate of PFS at two years was 9.2% in the unmethylated group compared to the 31.5% observed in the methylated group. When using *MGMT* methylation data obtained by dp_qMSP, the median OS in the unmethylated group was 12.6 months (95% CI 10.0–15.1) while this median was not reached in the methylated group (Fig. 3c). Consistent with the results obtained by MSP, there were significant differences between unmethylated and methylated

groups in terms of OS ($p = 0.014$, HR = 0.47, 95% CI 0.26–0.86) and PFS ($p = 0.001$, HR = 0.41, 95% CI 0.24–0.70). The rate of OS at two years was 19% in the unmethylated group compared to 45% in the methylated group. The median PFS was 7.0 months (95% CI 5.6–8.4) in the unmethylated dp_qMSP group and 16.0 months (95% CI 11.8–20.3) in the methylated dp_qMSP group (Fig. 3d). While the rate of PFS at two years was 10.8% in the unmethylated group compared to the 24.9% observed in the methylated group.

Comparison between dp_qMSP and MSP methods for progression evaluation according to ROC (t)

We performed ROC(t) curves to compare both MSP and dp_qMSP for predicting PFS and OS in our cohort of GBM patients. The time-dependent area under the curve or AUC(t) for OS was 0.49 when we analyzed the patients with the MSP method and 0.60 in dp_qMSP assay ($p=0.001$). The AUC(t) for PFS was 0.50 when we analyzed the patients with MSP method and 0.58 in dp_qMSP assay ($p=0.037$) (Fig. 4).

Discussion

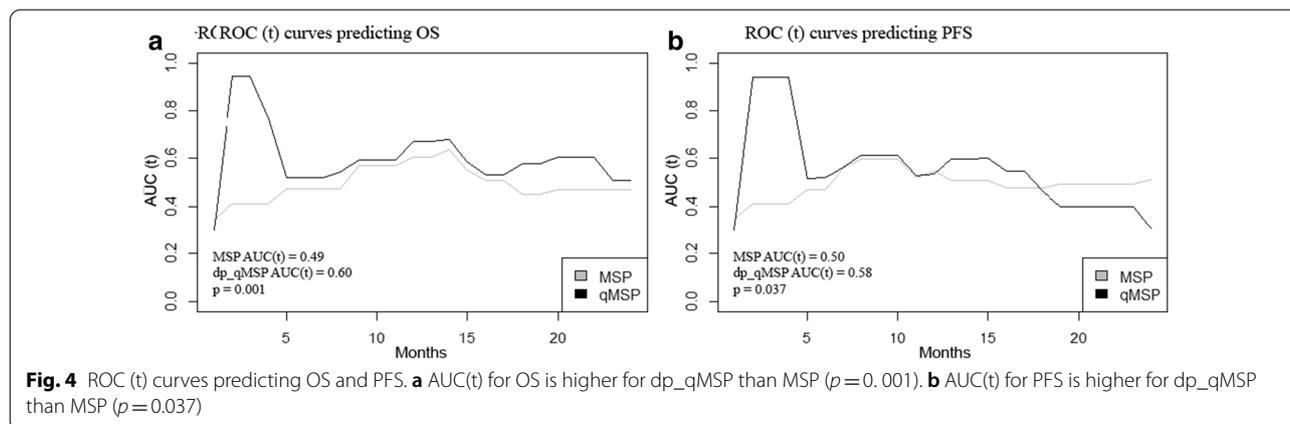
Food and Drug Administration and National Institutes of Health Biomarker Working Group define validation as a process to establish that the performance of a test is acceptable for its intended purpose [26]. In order to establish if the dp_qMSP test is suitable for *MGMT* methylation analysis, we performed comparison-of-methods studies between both dp_qMSP and MSP processes.

Firstly, we carried out a ROC study establishing the best cutoff methylation point at 3.75% and finding an excellent model (AUC=0.962). The sensitivity obtained was 100% and we detected eight additional positive samples that were not identified by MSP. Being strict, we considered them as false-positive, decreasing our specificity to 88.6%; although they could certainly be due to an increased sensitivity of our methodology compared to the MSP. In fact, the clinical response in terms of survival in these patients corresponds to the mean of patients harboring a methylated promoter or to the overall mean of survival in this pathology, but not lower; except in two cases that did not could undergo resection surgery and therefore, a worse prognosis was expected, as described in the literature [27–29].

It has been reported that different methodologies could give rise to different results. When Quillen et al. compared five methods to analyze *MGMT* methylation, found

in their study various discrepancies between the different assays used. Methylation-sensitive HRM and MethyLight obtained a weaker predictive value, whereas pyrosequencing was the best among the 5 techniques tested. In addition, Quillen's study confirmed effectiveness as prognostic value of *MGMT* promoter methylation assessed by MS-PCR [14]. The subsequent study of Yoshioka et al. confirmed these good results obtained by the MS-PCR [16]. Dp_qMSP is based on MS-PCR, but it is improved by combining the PCR chemistry with amplicon detection by double fluorescence probes with a MGB, which stabilizes the double-stranded probe template structure resulting in improved allele specificity [30]. Moreover, qPCR can exclude ambiguity of interpretation which may cause bias in conventional PCR and it presents an easier workflow [31]. Thus, if we also take into account that qPCR presents higher sensitivity than the SYBER-green-stained and gel-based detection under ultraviolet light we should not consider the new methylated samples identified by dp_qMSP to be false positives when using dp_qMSP, but rather that they are false negatives when using MSP. Furthermore, these results are supported by the parallel analytical validation of five of these samples performed in the MD Anderson Cancer center by using a modified methodology. Another possible cause that would explain this discrepancy is that the CpG 82 and/or 83 positions where our hydrolysis probe directed, could be methylated. Methylation of these positions would result in a positive result for dp_qMSP but could result in a negative result for MSP since in this methodology, these CpG positions are not considered.

With this in mind, we carried out further studies in order to decide the adequacy of both assays in terms of OS and PFS. The Kaplan–Meier analysis showed that patients with *MGMT* promoter methylation resulted in significantly longer PFS and OS than unmethylated patients, the same results as previously reported



independently of using MSP or dp_qMSP [7, 14]. Therefore, both techniques allow the classification of patients as responders or non-responders in terms of *MGMT* methylation.

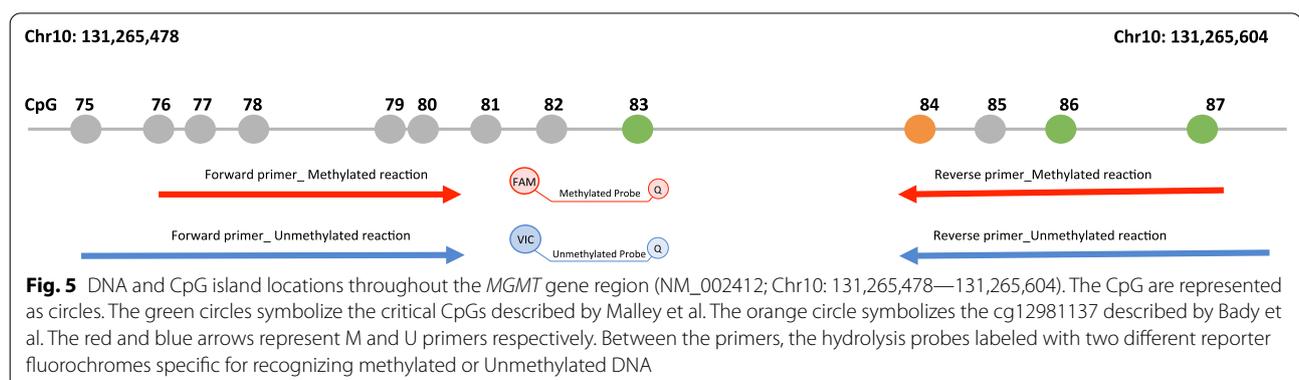
However, the question to be addressed is how well does the *MGMT* methylation biomarker evaluated by dp_qMSP distinguish between patients who respond to treatment and patients who do not at a given follow-up time. Cancer outcomes are very time-dependent and ROC curves that vary as a function of time may be more useful than the Kaplan–Meier analysis [32]. Therefore, ROC (t) has been used to compare the MSP and dp_qMSP and to establish the one that best fits the survival data. The AUC (t) for OS and PFS obtained was higher when we used the dp_qMSP method (0.49 versus 0.60 in OS and 0.50 versus 0.58 in PFS). We found significant differences between MSP and dp_qMSP, suggesting that the dp_qMSP assay might be more effective at detecting the *MGMT* methylation biomarker than the classic MSP assay.

In addition to the aforementioned advantages of using the dp_qMSP method, we may have obtained better results in AUC (t) particularly within the first 5 months after diagnosis in dp_qMSP because we are investigating the most important positions that have been shown to have a major impact on *MGMT* expression. Malley et al. described the methylation status of CpGs 83, 86, 87 and 89 as critical for transcriptional regulation, being the CpG 83 in our hydrolysis probe and CpG 86 and 87 in reverse primer. In addition, we have in our reverse primer the cg12981137, described by Bady et al. as one of the two more essential [10, 11] (Fig. 5).

Due to the absence of adequately standardized techniques, international harmonization of the *MGMT* biomarker is still an unmet clinical need. A main difficulty has been the lack of a gold standard for *MGMT* methylation detection independently of the technology used. This is in part due to the different CpGs interrogated within the same technology, as there is still no consensus on how many CpG sites should be explored. For example,

for pyrosequencing the cut-off values range from 2.7 to 35%, and the positions analyzed from four to more than 60 [15]. Several studies reported pyrosequencing as the method of choice for *MGMT* promoter methylation analysis in routine clinical practice [14, 33, 34] but, the current limitation of pyrosequencing is the absence of a consensus regarding an established cutoff for binary classification and concerning which are the most relevant CpG sites to analyze for clinical practice (as there are several pyrosequencing protocols that differ in regards to the number and position of the studied CpG sites) [15, 35–37]. The cutoff in pyrosequencing is calculated with the average of the different CpG positions analyzed by this technique and in some cases it gives rise to an indeterminate value called “gray zone” that is not capable of dichotomizing the cases, and there is no consensus on which of them most highly correlated with prognosis. In fact a recent article proposes to change this pyrosequencing calculation for a new analysis that could accurately predict the prognosis of patients in this “gray zone” [38] however, these data have not yet been validated. For all these reasons, *MGMT* methylation status has sometimes suffered from inconsistent results in the same tumor with different methods, mainly due to the lack of methodological standardization.

Undoubtedly and regardless of the methodology used, the settings for selecting the cutoff value, need to be identified with specific controls, allowing the results from each laboratory to be adapted according to the methodology used for DNA extraction, DNA bisulfite modification and the subsequent amplification method selected. We used MSP as a reference because it was the first method described and has been repeatedly shown to be of predictive value in randomized clinical trials [39–42]. However, MSP is not an automatized method, making it difficult to standardize, and results may be influenced by tumor heterogeneity and/or a subjective interpretation. One of the great advantages of dp_qMSP is that the amplification of both methylated and unmethylated reactions,



are carried out in the same PCR mixture, obtaining an accurate approximation of the percentage of one versus the other methylation status in a single sample. Moreover, dp_qMSP interrogates the most relevant positions that have been described in the literature, CpG 83, CpGs 86, CpG 87 as the best targets for methylation testing and critical for transcription regulation with the highest impact on *MGMT* expression and CpG 84 [10], described as one of the two essential positions that exhibited the strongest association with overall survival [11]. Furthermore, this amplification, in our experience, is reproducible when using different real-time PCR equipment such as the HT7900 or Step-One plus, which together with the use of a mathematical algorithm, would allow standardization between laboratories, as has been reported in the MethyLight technology, used for other epigenetic markers. The main advantage of dp_qMSP in this regard is that, unlike MethyLight, both reactions are amplified in parallel in the same mixture, simplifying the interpolation on two different genes in separate reactions as it is done in MethyLight. This would greatly favor its routine implementation in a clinical diagnostic laboratory, in addition to avoiding errors related to greater technical complexity.

Conclusion

Our study presents the evaluation of two techniques used for *MGMT* methylation: a standard MSP and a dp_qMSP, developed in our laboratory. The dp_qMSP method used in this study was not only more sensitive but also more time-efficient for the detection of *MGMT* biomarker. The method is based on qPCR assay that is carried out using two fluorochrome-labeled probes to quantify the percentage of methylated molecules in the tumor sample. We concluded that this assay is highly sensitive and easy to use with a well-established cutoff point, making it reliable and suitable for clinical use. Nevertheless, more multicenter studies are needed to confirm these results.

Materials and methods

Patient samples

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) GBM samples from 100 patients prospectively collected at University hospital La Paz, who underwent surgery or biopsy at the La Paz University Hospital between May 2014 and March 2020 were included in this study. The percentage of tumor cells in the tissue was evaluated previously by an expert pathologist to ensure the quality of the tumor sample. Inclusion criteria encompassed patients with signed informed consent, 18 years of age or older, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status of 0 to 3, histologically confirmed as a IDH-wild type

GBM and treated with temozolamide. All patients had a minimum follow-up of 3 months.

The demographic information of all the patients as well as type of surgery, treatment, progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were collected. This study was conducted under the approval of the ethics committee of the La Paz University Hospital with the ethics number of PI-2887 and in conformance with the principles of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants.

Nucleic acid isolation

Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue samples were deparaffinized using xylene. DNA from tissue samples and cells were extracted according to standard protocols using phenol-chloroform, chloroform and finally suspending in 20 µl of 1X TE [43].

Bisulfite modification of DNA

1000 ng of DNA from FFPE tissue was denatured by NaOH (0.2 mol/L) for 10 min at 37 °C and then modified by hydroquinone and sodium bisulfite treatment at 50 °C for 17 h. Modified DNA was purified using the Wizard DNA Clean-Up system (Promega, Madison, WI). Modification was completed by NaOH (0.3 mol/L) treatment for five minutes at room temperature followed by precipitation with glycogen, 10 mol/L ammonium acetate, and ethanol precipitation. Bisulfite modification of DNA resulted in the conversion of unmethylated cytosines to uracil, whereas methylated cytosines were resistant to modification and remained as cytosine [44].

Nested-PCR

We performed a nested PCR to improve sensitivity and specificity. The reaction mixture contained 1.1 µl of bisulfite-modified DNA, 3 µl buffer (Biotools Buffer 10X), 4 µl dNTPs (10 mM), 1 µl MgCl₂ (50 nM), 2 µl primers (100 ng/µL) and 0.75 µl (Biotools DNA polymerase 1U/µl) enzyme in a total reaction volume of 20.5 µl. Nested PCR conditions were 94°C for 5 min, followed by 40 cycles at 94 °C for one min, 54 °C for one min, 72 °C for one min and 72°C for eight min. The product of the reaction is a 274 bp amplicon. The sequences (5'-3') used were as follows: forward primer (BS_F) GGATATGTTGGGATA GTT and reverse primer (BS_R) CCGAAAAAAAC TAAACAACACCT. Amplicons resulting from this PCR reaction were used as template for MSP and dp_qMSP.

Methylation-specific PCR (MSP)

The *MGMT* methylation status of patients' samples was determined in the clinical routine by MSP. Consequently, amplicons resulting from nested-PCR were amplified using specific primers that discriminate methylated (M)

and unmethylated (U) DNA previously described by Esteller et al. [45].

Primer sequences for M and U PCR reactions are as follows: for the methylated sequence MGMT_ME, TTT CGACGTTCTAGGTTTTTCGC; MGMT_MR: GCA CTCTTCCGAAAACGAAACG and for the unmethylated sequence MGMT_UF, TTTGTGTTTTGATGTTTG TAGGTTTTTGT; MGMT_UR, AACTCCACACTC TTCCAAAAACAAAACA. Primers for U reactions were analogous to M reactions, except CG was replaced with TG in the forward primer or CA in reverse primers. In addition, the U primers have additional base pairs, to be able to distinguish both reactions in an acrylamide gel. Primers were designed for the detection of an 81 bp fragment obtained from the methylated reaction and a 93 bp fragment from the unmethylated reaction. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) was used as unmethylated control and PBMC methylated in vitro with the enzyme CpG-Methyltransferase (M.SssI) was used as the methylated control.

The MSP reaction was performed in a final volume of 25 μ l containing 1.1 μ l of amplicons resulting from nested-PCR, 4.4 μ l dNTPs (10 mM), 0.4 μ l of each primers (100 ng/ μ L), 0.5 μ l DNA polymerase (Biotools DNA polymerase 1U/ μ l) and 11.3 μ l H₂O. The MSP reaction was carried out with the following settings: for M reaction, 37 cycles of 95 °C for one min, 68 °C for one min, and 72 °C for 50 s; for U reaction, 35 cycles of 95 °C for one min, 60 °C for one min, and 72 °C for 50 s. The MSP products were electrophoresed on a 6% non-denaturing acrylamide gels with appropriate size markers and the presence or absence of a PCR product analyzed under ultraviolet light. A sample is considered methylated when amplification of a band is observed in both reactions, methylated and unmethylated (in the sample there will always be DNA of non-tumor origin that will be amplified as unmethylated). A sample is considered unmethylated when only a band amplification is observed in the reaction of the modified and unmethylated DNA specific primers.

Quantitative methylation-specific PCR (dp_qMSP)

MGMT-dp_qMSP is a customized quantitative real-time PCR (qPCR) that specifically detects methylated and unmethylated bisulfite-modified DNA molecules from the same chromosomal location, specifically at the MGMT promoter area.

The dp_qMSP assay was carried out using ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). We have used the same primers as those used for the MSP. In addition, we designed two hydrolysis probes, specifically for methylated or unmethylated DNA molecules. The methylated MGMT hydrolysis probe was labelled with a

FAM fluorochrome at the 5' end (FAM-CAAATCGCA AACGATA-MGB-NFQ) and the unmethylated MGMT hydrolysis probe was labelled with a VIC fluorochrome at the 5' end (VIC-CAAATCACAAACAATA-MGB-NFQ). Both probes have a non-fluorescent quencher (NFQ) with a minor groove binder (MGB) at the 3' end. Hydrolysis probes for M and U reactions were identical, except at CpG sites, which were unique for recognizing M or U positions.

The amplification mixture consisted of 9.5 μ l of DNA Master Mix (QuantiTect Multiplex PCR Master Mix, QIAGEN), 8.4 μ l of H₂O, 0.125 μ l each primer (280 ng/ μ L), 0.06 μ l each probe (100 μ M), and 3.5 μ l of template DNA in a final volume of 20 μ l. PBMC was used as unmethylated control and PBMC in vitro methylated are used as the methylated control. qPCR reaction involved an initial denaturation at 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles of 94 °C for one min and 60 °C for one min. Data acquisition and analysis was performed on the RQ Manager 1.2.1 software. The percentage of methylation was carried out using the formula previously described = $100 / (1 + (2^{-(Cq_{\text{methylated}} - Cq_{\text{unmethylated}})}))$ [25].

Statistical analysis

The association between methylation and clinicopathological status (qualitative variables) were analyzed using the chi-square test (type of surgery, ECOG) or Fisher's exact test (gender). For the comparison between qualitative methylation and age (quantitative data), the t-student test for independent data was used. Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis was performed to determine the optimal cutoff for dp_qMSP. Samples were categorized as methylated or unmethylated based on the cutoff determined through ROC curve analysis. The sensitivity and specificity were obtained using MSP as the reference. In addition, time-dependent ROC curves or ROC(t) were used for evaluating and comparing the prognostic value of the MGMT methylation marker between MSP and dp_qMSP [32].

The survival analysis were carried out using the Kaplan–Meier analysis and the Cox regression. In order to compare the survival functions by groups, log-rank tests were performed. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. Confidence intervals (CIs) were made using a 95% confidence level. Statistical analysis was conducted by a biostatistical expert using the SAS 9.3 program (SAS Institute, Cary, NC, USA) and R version 4.0.0.

Abbreviations

MGMT: Methylguanine-DNA methyltransferase; GBM: Glioblastoma; DMR2: Differentially methylated region; OS: Overall survival; MSP: Methylation-specific PCR; MS-MLPA: Multiplex ligation-dependent probe amplification;

HRM: High-resolution melting; COBRA: Combined bisulfite restriction analysis; qMSP: Quantitative methylation specific PCR; FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; PFS: Progression-free survival; ROC: Receiver Operating Characteristics; M: Methylated; U: Unmethylated; qPCR: Quantitative real-time PCR; NFQ: Non-fluorescent quencher; MGB: Minor groove binder; CI: Confidence interval; AUC: Area under the curve.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01044-2>.

Additional file 1: Supplementary Figure 1. Uncropped gel from Fig. 2.

Additional file 2: Supplementary Figure 2. Examples of MSP and dp_qMSP amplifications from the same samples. **A** MSP samples are shown in duplicate U: Unmethylated reaction, M: methylated reaction, C-: Unmethylated control sample and C+: IVD control sample. The water is tested for contamination. **B** dp_qMSP amplifications showing the FAM and VIC probes for each sample tested together with the positive and negative controls (only amplify the FAM and VIC probes respectively, there is no amplification when the VIC probe is used with the positive control and not the FAM probe when the negative control is tested). For sample number 100 there is only amplification with the FAM probe (100% methylation). **C** Reflects the percentage of methylation in each case after application of the formula.

Additional file 3: Supplementary Figure 3. Agarose gel with the MGMT promoter amplification of five samples with discrepancies between MSP and dp_qMSP. It has been performed in a collaborative center (MD Anderson Madrid) with an alternative methodology using EpiTec for DNA modification and using the next primers and conditions for PCR amplification: MGMT-M-F TTTCGACGTTCTGAGGTTTCGC and MGMT-M-R GCACCTTCCGAAAACGAAAC MGMT-U-F TTTGTGTTTGATGTTGTAGGTTTGT and MGMT-U-R AACTCCACACTCTTCCAAAACAAAACA For both reactions the PCR settings are 58°C and 35 cycles. The arrows indicate a slightly amplification at the methylation reaction in samples 1, 78 and 100. For none of those patients these results were considered positive for clinical diagnosis.

Acknowledgements

The authors thank Hayley Pickett from ServingMed.com and produccion@morote.net for the English language/style correction and to the Innovation Unit from IdiPAZ for the R&D&I management in the patent application process associated with the technology described in this manuscript. The authors also want to recognize Repsol for providing the equipment for real time determinations.

Authors' contributions

IIC, RR: Conception and design of the work; RR, JCF, OP, IE, IG, JC, VM acquisition and analysis; RR, CRA, ILG, GMB, SPZ, IIC interpretation of data; RR, VM, GMB, IIC have drafted the work or substantively revised it. All authors have approved the submitted version. All authors have agreed both to be personally accountable for the author's own contributions and to ensure that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even ones in which the author was not personally involved, are appropriately investigated, resolved, and the resolution documented in the literature. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by the "Fondo de Investigación Sanitaria-Instituto de Salud Carlos III" PI18/00050, DTS20/00029 and the European Regional Development Fund/European Social Fund FIS FEDER/FSE, Una Manera de Hacer Europa.

Availability of data and materials

The dataset supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional file.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was conducted under the approval of the ethics committee of the La Paz University Hospital with the ethics number of PI-2887 and in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. The information provided in this study is included in a patent application process (EP19382299.6) and therefore it must be treated, solely and exclusively, based on the purposes of this paper, and should not be published if it does not respond to the purpose thereof. This application and its contents are protected by the Spanish Law on Intellectual and Industrial Property, prohibiting the distribution, reproduction, disclosure, transformation and sale of the entire document or part thereof, as well as the use, under any circumstances, of the trademarks appearing therein, without the prior express written consent of the Foundation for Biomedical Research of La Paz University Hospital-IdiPAZ (FIBHULP), which holds the ownership.

Author details

¹ Epigenetics Laboratory. INGEMM, Paseo La Castellana 261. Edificio Bloque Quirúrgico Planta -2. University Hospital La Paz, 28046 Madrid, Spain. ² Experimental Therapies and Novel Biomarkers in Cancer. IdiPAZ, Madrid, Spain. ³ Pathology Department, La Paz University Hospital, Madrid, Spain. ⁴ Medical Oncology Department, La Paz University Hospital, Madrid, Spain. ⁵ Biostatistics Unit, La Paz University Hospital. IdiPAZ, Madrid, Spain. ⁶ MD Anderson Cancer Center, Madrid, Spain. ⁷ Biochemistry Department, UAM/ IIBm (CSIC-UAM), IdiPAZ, Fundación MD Anderson Internacional, Madrid, Spain. ⁸ CIBERONC, Madrid, Spain.

Received: 11 November 2020 Accepted: 28 February 2021

Published online: 09 March 2021

References

- Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983;301(5895):89–92.
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med*. 1995;1(7):686–92.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349(21):2042–54.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(7):564–9.
- Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2(Suppl 1):S4–11.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000;343(19):1350–4.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987–96.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997–1003.
- Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *Lancet Neurol*. 2010;9(7):717–26.
- Malley DS, Hamoudi RA, Kocalkowski S, Pearson DM, Collins VP, Ichimura K. A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma cells and xenografts. *Acta Neuropathol*. 2011;121(5):651–61.

11. Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, van den Bent MJ, Marosi C, et al. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol*. 2012;124(4):547–60.
12. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(5):1827–31.
13. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, et al. Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e33449.
14. Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, Carpentier C, Labussiere M, Lesimple T, et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer*. 2012;118(17):4201–11.
15. Bienkowski M, Berghoff AS, Marosi C, Wohrer A, Heinzl H, Hainfellner JA, et al. Clinical Neuropathology practice guide 5–2015: MGMT methylation pyrosequencing in glioblastoma: unresolved issues and open questions. *Clin Neuropathol*. 2015;34(5):250–7.
16. Yoshioka M, Matsutani T, Hara A, Hirono S, Hiwasa T, Takiguchi M, et al. Real-time methylation-specific PCR for the evaluation of methylation status of MGMT gene in glioblastoma. *Oncotarget*. 2018;9(45):27728–35.
17. Barault L, Amatu A, Bleeker FE, Moutinho C, Falcomata C, Fiano V, et al. Digital PCR quantification of MGMT methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(9):1994–9.
18. Park CK, Kim J, Yim SY, Lee AR, Han JH, Kim CY, et al. Usefulness of MS-MLPA for detection of MGMT promoter methylation in the evaluation of pseudoprogression in glioblastoma patients. *Neuro Oncol*. 2011;13(2):195–202.
19. Yamashita S, Yokogami K, Matsumoto F, Saito K, Mizuguchi A, Ohta H, et al. MGMT promoter methylation in patients with glioblastoma: is methylation-sensitive high-resolution melting superior to methylation-sensitive polymerase chain reaction assay? *J Neurosurg*. 2018;130(3):780–8.
20. Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hubner A, Ehrentraut D, Schramm J, et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn*. 2007;9(3):368–81.
21. Wenger A, Ferreyra Vega S, Kling T, Bontell TO, Jakola AS, Caren H. Intratumor DNA methylation heterogeneity in glioblastoma: implications for DNA methylation-based classification. *Neuro Oncol*. 2019;21(5):616–27.
22. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol*. 2010;6(1):39–51.
23. Riemenschneider MJ, Fischer J, Grassow-Narlik M, Mawrin C, von Deimling A, Pietsch T, et al. Quality assurance in neuropathology: Experiences from the round robin trials on IDH mutation and MGMT promoter methylation testing launched by the Quality Assurance Initiative Pathology (QuiP) in 2018 and 2019. *Clin Neuropathol*. 2020;39(5):203–11.
24. Parker NR, Hudson AL, Khong P, Parkinson JF, Dwight T, Ikin RJ, et al. Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Sci Rep*. 2016;6:22477.
25. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(8):E32.
26. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD)2016.
27. Lacroix M, Abi-Said D, Fournier DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*. 2001;95(2):190–8.
28. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg*. 2011;115(1):3–8.
29. Vecht CJ, Avezaat CJ, van Putten WL, Eijkenboom WM, Stefanko SZ. The influence of the extent of surgery on the neurological function and survival in malignant glioma. A retrospective analysis in 243 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1990;53(6):466–71.
30. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;67(1):6–20.
31. Thammaiah S, Venkobarao MC, Sathyavanthan H, Mirnalini AS. Quantitative polymerase chain reaction-based detection of HPV 16 E6 and E7 DNA in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2018;47(9):873–9.
32. Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS. Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. *Biometrics*. 2000;56(2):337–44.
33. Johannessen LE, Brandal P, Myklebust TA, Heim S, Micci F, Panagopoulos I. MGMT gene promoter methylation status - assessment of two pyrosequencing kits and three methylation-specific PCR methods for their predictive capacity in glioblastomas. *Cancer Genom Proteom*. 2018;15(6):437–46.
34. Preusser M, Berghoff AS, Manzl C, Filipits M, Weinhausel A, Pulverer W, et al. Clinical neuropathology practice news 1–2014: pyrosequencing meets clinical and analytical performance criteria for routine testing of MGMT promoter methylation status in glioblastoma. *Clin Neuropathol*. 2014;33(1):6–14.
35. Brigliadori G, Foca F, Dall'Agata M, Rengucci C, Melegari E, Cerasoli S, et al. Defining the cutoff value of MGMT gene promoter methylation and its predictive capacity in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2016;128(2):333–9.
36. Malmstrom A, Lysiak M, Kristensen BW, Hovey E, Henriksson R, Soderkvist P. Do we really know who has an MGMT methylated glioma? Results of an international survey regarding use of MGMT analyses for glioma. *Neurooncol Pract*. 2020;7(1):68–76.
37. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(7):372–85.
38. Chai RC, Liu YQ, Zhang KN, Wu F, Zhao Z, Wang KY, et al. A novel analytical model of MGMT methylation pyrosequencing offers improved predictive performance in patients with gliomas. *Mod Pathol*. 2019;32(1):4–15.
39. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res*. 2004;10(6):1871–4.
40. Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann RD, et al. Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *J Clin Oncol*. 2006;24(27):4412–7.
41. Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(9):916–26.
42. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(7):707–15.
43. Ibanez de Caceres I, Dulaimi E, Hoffman AM, Al-Saleem T, Uzzo RG, Cairns P. Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer. *Cancer Res*. 2006;66(10):5021–8.
44. Ibanez de Caceres I, Cortes-Sempere M, Moratilla C, Machado-Pinilla R, Rodriguez-Fanjul V, Manguan-Garcia C, et al. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2010;29(11):1681–90.
45. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 1999;59(4):793–7.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.