

Búsqueda de nuevos biomarcadores genéticos en gliomas de alto grado

Search for new genetic biomarkers in high-grade gliomas

Lina Marcela Barrera-Arenas^{1,2*}, Julieth Restrepo², León Darío Ortíz^{1,3,4}, Mauricio Camargo¹

Resumen

Los gliomas de alto grado son los tumores cerebrales más comunes dentro de las neoplasias del sistema nervioso central (SNC); presentan una supervivencia media de sólo 18 meses, debido principalmente a su resistencia a las diferentes estrategias terapéuticas. A la fecha, el único tratamiento que ha logrado aumentar algunos meses la supervivencia de los pacientes con estos gliomas es el protocolo diseñado por Stupp et al. (2005), que consta de una cirugía junto con temozolamida (TMZ) y radioterapia (RT) adyuvante. Sin embargo, aunque prolonga hasta 18 meses la vida de los pacientes, aún carece de valor pronóstico sensible y/o específico.

Hasta ahora sólo existen tres marcadores moleculares de relevancia clínica para esta enfermedad; sin embargo, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos detectó un grupo de individuos (“respondedores excepcionales”) que parecen tener una supervivencia más larga asociada a la hipermetilación del promotor del gen *MGMT*. Estudios recientes sugieren que en los “respondedores excepcionales” hay otros factores genéticos no descritos aún, involucrados en la reparación de daños en el ADN.

En esta revisión se sugiere emplear la reparación del ADN como un biomarcador cuando los pacientes con gliomas de alto grado son tratados con los genotóxicos TMZ y RT. Además, se describen con detalle tres técnicas que permiten cuantificar la inestabilidad genética de estos pacientes: la detección de Micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica mediante el método de Fenech, la detección de MN en reticulocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo, y el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH).

Palabras claves: diagnóstico, genética, pronóstico, reparación del ADN, sangre, valor predictivo de las pruebas

Abstract

High-grade gliomas are the most common brain tumors within central nervous system (CNS) neoplasms; they have an average survival of only 18 months, mainly due to their resistance to different therapeutic strategies. To date, the only treatment that has managed to improve in some months the survival of patients with these gliomas is the protocol designed by Stupp et al. (2005), which consists of surgery paired with adjuvant temozolamide (TMZ), and radiotherapy (RT). However, despite prolonging the life of patients up to 18 months, it still lacks a sensitive and/or specific prognostic value.

So far, there are only three molecular markers of clinical relevance for this disease; however, the National Institute of Health of the United States, detected a small group of individuals (“exceptional responders”) that

1. Grupo Genética, Regeneración y Cáncer (GRC), Instituto de Biología, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

2. Grupo de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Remington, Medellín, Colombia.

3. Instituto de Cancerología-Clinica Las Américas, Medellín, Colombia.

4. Grupo de Ciencias Farmacológicas y Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Área farmacogenómica, CES, Medellín, Colombia.

* Autor de correspondencia: <lina.barrera@uniremington.edu.co>



seem to have a longer survival associated with hypermethylation of the promoter of gene *MGMT*. Recent studies suggest that in “exceptional responders” there are other genetic factors not yet described involved in DNA damage repair.

In this review the use of DNA repair as a biomarker is suggested when patients with high-grade gliomas are treated with genotoxics TMZ and RT. Furthermore, three techniques that allow quantification of the genetic instability of these patients are detailed: detection of Micronuclei (MN) in peripheral blood lymphocytes by Fenech method, detection of MN in peripheral blood reticulocytes by flow cytometry, and Sister Chromatid Exchange (SCE).

Keywords: diagnosis, genetics, prognosis, DNA repair, blood, predictive value of the tests

INTRODUCCIÓN

Los gliomas son los tumores más comunes del sistema nervioso central (SNC) en adultos, originados en la glía, estructura conformada por astrocitos, oligodendrocitos y ependimocitos, precursores de los astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas, respectivamente (Bleeker et al. 2012; Olar y Sulman 2015). Además de la anterior clasificación histológica, estos tumores han sido agrupados, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), de acuerdo con el grado de malignidad, en dos grupos mayores: focales o difusos (Louis et al. 2016). Cuando el glioma es focal, es de márgenes circunscritas y puede ser de grado I (pilocítico o de células gigantes), o de grado II o III conocido como xantastrocitoma pleomórfico; por el contrario, los gliomas difusos presentan márgenes infiltrantes y pueden ser astrocitomas grado I (aquellos usualmente curables con cirugía), grado II o astrocitomas difusos infiltrantes, grados III o astrocitoma anaplásico y grado IV o glioblastomas (GBM) que se caracterizan por la proliferación celular y vascular, el pleomorfismo celular y la necrosis. Los tumores grados III y IV se denominan gliomas de alto grado, siendo los tumores cerebrales más comunes y candidatos para el tratamiento complementario a la cirugía con temozolamida (TMZ) y radioterapia (RT) adyuvante, conocido como Protocolo STUPP (Louis et al. 2007; Marumoto y Saya 2012; Olar y Sulman 2015).

Entre las neoplasias primarias del SNC, los gliomas son los tumores más comunes, con una incidencia de 13/100.000 habitantes/año siendo los más frecuentes los gliomas de alto grado (7/100.000) y entre estos, los astrocitomas (5/100.000). Las tasas promedio de supervivencia son 7 años para los gliomas de

bajo grado, 3 años para los astrocitomas anaplásicos, y solo 1,4 años en los GBM (Ferlay et al. 2015). International agency of research on cancer (IARC 2018) reportó que, en las regiones de Centro y Sur América, los cánceres de cerebro y SNC fueron la tercera causa de morbilidad y mortalidad, con 29.539 nuevos casos y 11.000 muertes, dado un incremento significativo en la tasa de mortalidad en países como Brasil y Colombia (Ostrom et al. 2014; Piñeros et al. 2016). IARC (2018) reportó para Colombia que los tumores cerebrales, incluidos los gliomas de alto grado, ocupan la posición 15 para los diferentes tipos de cáncer en incidencia y mortalidad con 1884 y 1176 casos respectivamente (Ferlay et al. 2015; Pardo y de Vries 2017).

La supervivencia media de los pacientes con este tipo de tumores es muy corta, principalmente por la resistencia al protocolo de terapia más utilizado en el mundo conocido como STUPP (Stupp et al. 2005; Stupp et al. 2009), único tratamiento que ha logrado mejorar, en algunos meses, la sobrevida de los pacientes con gliomas de alto grado (Louis et al. 2007; Louis et al. 2016). De ahí la apremiante necesidad de encontrar biomarcadores pronóstico; esta búsqueda ha progresado para los gliomas de bajo grado (Hartmann et al. 2011; Guan et al. 2014; Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2015), pero ha sido esquiva en los de alto grado, especialmente en los GBM (Cohen y Colman 2015; Eckel-Passow et al. 2015). Como tratamiento de segunda línea, algunos pacientes en recaída son llevados a una nueva cirugía; también se recurre al tratamiento con el antiangiogénico bevacizumab y los quimioterapéuticos irinotecán (CPT-11) o yemozolomida (Balaña y Cardona 2008; Mittal et al. 2015).

En la actualidad, existen tres marcadores moleculares de relevancia clínica para este tipo de patología: la detección de la co-delección 1p/19q, el estado de metilación del promotor del gen *MGMT* y mutaciones en los genes *IDH1* y *2* (Takahashi et al. 2013; Cohen y Colman 2015; Wang et al. 2015; Pace et al. 2017). Pero a pesar de los avances recientes en la terapia, aún no se ha encontrado un factor pronóstico sensible y/o específico. El Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos reportó un pequeño grupo de individuos que parecen presentar una supervivencia más larga (“respondedores excepcionales”) asociada a la hipermetilación del promotor del gen O⁶-metil-Guanina-ADN metiltransferasa (*MGMT*) (Krex et al. 2007; Felsberg et al. 2009; Mellai et al. 2009). Sin embargo, estudios recientes muestran que en los “respondedores excepcionales” pueden existir otros factores genéticos pronósticos, como la respuesta al daño en el ADN, por lo cual es necesario su estudio y comprensión (Mullard 2014; Sheridan 2014). Otros marcadores, utilizados como segunda opción en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, son las mutaciones en los genes *ATRX* y *p53* y la activación del gen del factor de crecimiento epidérmico III (*EGF-v/III*) (Marumoto y Saya 2012; Rudà et al. 2015; Alentorn et al. 2015). Recientemente, se han adicionado a la lista la hiper-metilación del promotor de los genes *TERT* y *p16* y la expresión de Olig2 y PDGFRA (Eckel-Passow et al. 2015).

En la presente revisión se describe cómo se puede emplear la reparación del ADN como biomarcador de respuesta genómica global asociada a la respuesta reparativa individual al tratamiento con los genotóxicos TMZ y RT, en los pacientes con gliomas de alto grado. Para tal fin, se realizó una búsqueda en PubMed con los descriptores en inglés “High grade gliomas”, “Biomarkers” y “ADN Repair”, con una ventana de búsqueda entre los años 2005 y 2019 (375 artículos).

BIOMARCADORES EN GLIOMAS BASADOS EN LA REPARACIÓN DEL ADN

Es bien sabido que el tratamiento con el protocolo STUPP genera, en los pacientes con gliomas de alto grado, daños en el ADN como quiebres de cadena

sencilla (SSB) y quiebres de cadena doble (DSB), inducidos por la radiación ionizante y el agente alquilante TMZ.

La TMZ induce muerte celular, principalmente por la generación del aducto O⁶-metil-Guanina (O⁶MeG) en el ADN (Roos et al. 2009; Quiros et al. 2011). Sin embargo, las células cuentan con la enzima suicida O⁶-metil-Guanina-ADN metiltransferasa (*MGMT*), proteína reparadora del ADN que remueve el grupo alquilo de la posición O⁶ de la guanina y O⁴ de la timina que ocasionan malos apareamientos durante la replicación celular, y en buena medida contrarresta estas metilaciones, permitiendo que las células resistan ciertos niveles de aductos metilantes. En consecuencia, la actividad de *MGMT* combinada con un estado de hipermetilación de su promotor, aumentan su capacidad reparadora. Así, la sobreexpresión del gen O⁶-metil-Guanina-ADN metiltransferasa (*MGMT*) y de su proteína *MGMT*, se utilizan como marcadores predictivos para la respuesta de los gliomas de alto grado, pues esta enzima elimina la citotoxicidad de los aductos alquilantes generados por la TMZ (Quiros et al. 2011; Alentorn et al. 2015; Ranjit et al. 2015).

Cuando la cantidad de enzima *MGMT* no es suficiente para reparar este tipo de lesión, el aducto O⁶MeG se procesa por la vía de reparación de mal apareamiento de bases (MMR); sin embargo, como esta vía requiere dos rondas de replicación del ADN, se pueden generar fácilmente DSB que, al no ser reparados, desencadenan la apoptosis en las células tumorales (Brandes et al. 2006; Takahashi et al. 2013; Minniti y Enrici 2014; Ranjit et al. 2015). Si esta vía es saturada por la cantidad de daño acumulado en los tejidos, aumenta el número de mutaciones en algunas neoplasias cerebrales (Brandes et al. 2006; Bleeker et al. 2012; Minniti y Enrici 2014).

La RT usualmente se realiza en dosis citotóxicas, generando daños a través de dos mecanismos de acción: 1) Directo, al inducir lesiones sobre el ADN como oxidación de bases dañadas, sitios abásicos, SSB y DSB. Si el daño no es reparado, y en particular los DSB, la célula va directamente a la muerte a través de una catástrofe celular. 2) Indirecto, donde se producen radicales libres que inducen muerte

celular en los tejidos a través de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), las cuales pueden atacar el ADN, generando principalmente DSB (Begg et al. 2011).

A dosis sub-citotóxicas (menores a IC₅₀) las células se pueden proteger contra DSB a través de dos vías de reparación: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR). La NHEJ es el mecanismo de reparación predominante en los organismos multicelulares y en las células diferenciadas en G₀ (Roos et al. 2009; Quiros et al. 2011). A diferencia de la NHEJ, la HR es el principal mecanismo de reparación de DSB libre de errores, donde una cromátida toma como molde a su hermana para realizar la reparación y se genera un ICH; esta respuesta al daño provoca un aumento de los niveles de ICH en la célula (Tokuda y Bodell 1988; Lim et al. 2014a).

Otro tipo de daño generado por el protocolo STUPP son los SSB, detectados por la proteína PARP; si no se realiza la reparación de esta lesión a nivel nuclear, un SSB no reparado podría generar un DSB en la siguiente fase de replicación, si se trata de célula proliferativa o indiferenciada. En este contexto resultan interesantes las observaciones que PARP se encuentra sobre-expresada en tejidos tumorales cerebrales y es indetectable en cerebro sano, por lo que se le considera un marcador para gliomas de alto grado. De hecho, su presencia en GBM se asocia a señalización apoptótica, tanto en este tipo de tumor como en muchos otros cánceres (Javle y Curtin 2011; Galia et al. 2012; Gil Del Alcazar et al. 2016).

En la actualidad, se pueden detectar, por diferentes métodos, las alteraciones en la reparación del ADN en pacientes con gliomas de alto grado tratados con TMZ y RT (Galia et al. 2012) y su relación con la respuesta terapéutica. Los tres métodos para detectar daño genético que permiten buscar correlación con susceptibilidad, pronóstico y respuesta terapéutica en estas neoplasias son los siguientes:

DETECCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA MEDIANTE EL METODO DE FENECH

El ensayo de micronúcleos (MN), en linfocitos de sangre periférica, detecta clastogénesis y aneugénesis, como por ejemplo, rupturas o pérdida cromosómicas, fenómeno que es multicausal, aunque generalmente está ligado a errores en la replicación del ADN y rompimientos cromatídicos o cromosómicos, causados por la exposición celular a radiaciones ionizantes o genotóxicos como los alquilantes del ADN, o a una combinación entre exposición y variaciones individuales en la respuesta al daño genotóxico (Chang et al. 2011). Los fragmentos cromosómicos acéntricos o los cromosomas rezagados en anafase, quedan excluidos durante la ana-telofase y no se incorporan correctamente al núcleo de la célula hija, generando un MN visible al microscopio óptico. Lo más frecuente es que el efecto genotóxico observado en forma de MN, provenga de fragmentos cromosómicos acéntricos, por ejemplo, del efecto clastogénico que es el evento más común (Bonassi et al. 2007; Araldi et al. 2015).

Fenech y colaboradores (1999) publicaron los primeros estudios usando MN como biomarcador de genotoxicidad al correlacionar la frecuencia elevada de MN en linfocitos de sangre periférica con un aumento en el riesgo de padecer cáncer (Fenech et al. 1999; Bonassi et al. 2007), porque las alteraciones citogenéticas hacen parte del fenotipo tumoral, de acuerdo a la hipótesis que el daño cromosómico está involucrado directamente en la etiología del cáncer (Bloching et al. 2000; Murgia et al. 2008).

El uso de los MN, como marcador de susceptibilidad a cáncer, está validado por muchos estudios donde se han encontrado niveles elevados de MN en linfocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer antes de la quimioterapia o la RT y también en pacientes afectados con enfermedades congénitas propensas a cáncer como el síndrome de Bloom y la ataxia telangiectasia (Bonassi et al. 2007; Murgia et al. 2008; Chang et al. 2011), lo que evidenciaría la presencia en sangre circulante de factores genotóxicos de naturaleza aún desconocida, o una posible propensión a padecer la enfermedad, como se ha observado en otros estudios

sobre diferentes tipos de cáncer (Fenech et al. 1999; Bloching et al. 2000; Bonassi et al. 2007; Murgia et al. 2008; Chang et al. 2011; Araldi et al. 2015).

Un estudio demostró la asociación entre la aparición de cáncer pancreático y el nivel de inestabilidad cromosómica (frecuencia de MN) en linfocitos de sangre periférica, al comparar 346 pacientes con adenocarcinoma pancreático y una población de 449 controles sanos (Chang et al. 2011). Sin embargo, aunque la estadística es claramente significativa [odds ratio (OR): 8,32, 95 % confidence interval (CI): 5.06-13.67, $p < 0,001$], es difícil establecer la relación causal entre el aumento en el número de MN y el riesgo de padecer la enfermedad, pues este aumento puede ser consecuencia de la patología (causalidad reversa) o el reflejo de una susceptibilidad individual a eventos que causan inestabilidad genómica (Chang et al. 2011).

Esta técnica suministra información relevante con respecto a la respuesta al daño pues permite determinar si es un evento clastogénico o aneugénico; sin embargo, tiene la desventaja que toma mucho tiempo en el procesamiento de la muestra, pues incluye un cultivo que tarda varios días y sólo se analizan 1000 eventos/célula/persona. Aunque de replicarse este tipo de resultados tendrían el potencial de convertirse en un instrumento de ayuda para detectar personas en alto riesgo, además de ser un método efectivo y sencillo en cuanto a la obtención de las muestras y el análisis de resultados. En efecto, una de las estrategias más prometedoras para la prevención del cáncer es el desarrollo y validación de biomarcadores que puedan anticiparse al diagnóstico clínico.

DETECCIÓN DE MICRÓNÚCLEOS EN RETICULOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Otro método que cuantifica la inestabilidad cromosómica es la detección de MN en reticulocitos (RET) a través de citometría de flujo; esta alternativa automatizada acorta los tiempos de análisis y aumenta el poder estadístico incrementando hasta en 20X el número de células analizables/muestra (Dertinger et al. 2007a; Hanahan y Weinberg 2011; Balmus et al. 2015; Barrera et al. 2018), en comparación con el método convencional de Fenech de MN en linfocitos

de sangre circulante, el cual requiere visualización microscópica y pre-cultivo celular para inducir binucleación (Fenech et al. 1999; Bonassi et al. 2007; Dertinger et al. 2007b; Fenech et al. 2011).

Las bases conceptuales de esta metodología se refieren a la población de eritroblastos mitóticamente activa, como precursores de eritropoyesis en la médula ósea, los cuales expulsan sus núcleos pocas horas después de la última mitosis, dando origen a las células enucleadas denominadas eritrocitos inmaduros o RET, blancos de observación inicial para el test original *in vivo* de MN obtenidos en extendidos de médula ósea de ratones, estandarizado por Schmid en 1975 (Schmid 1975; Araldi et al. 2015).

En la citometría de flujo la detección de MN se realiza mediante la tinción diferencial de los RET utilizando el anticuerpo anti-CD-71, detector de la transferrina, proteína específica para esta población; además, teniendo en cuenta que los RET son similares en tamaño a las plaquetas, pueden diferenciarse, filtrarse y descartarse empleando anti-CD-61, sin necesidad de realizar pre-cultivo en presencia de un mitógeno (Bonassi et al. 2007; Chen et al. 2010). Sin embargo, este método MN-RET tiene algunas desventajas tales como, el citómetro no distingue si una célula tiene un MN o varios, a pesar de la baja probabilidad de ocurrencia y no permite distinguir si la micronucleación fue causada por efecto clastogénico o aneugénico. Esto último se puede investigar con la técnica convencional de Fenech combinada con hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Balmus et al. 2015).

Dertinger y colaboradores (2007), fueron los primeros en estandarizar esta técnica y demostrar que había un incremento en el número de MN en pacientes expuestos a medicamentos antineoplásicos (Dertinger et al. 2007a). Otro estudio, realizado por Barrera y colaboradores (2018), demostró que existe una posible predisposición genética de pacientes con gliomas de alto grado, dados los altos niveles de inestabilidad cromosómica *in vivo* encontrados al compararlos con controles sanos (Barrera et al. 2018).

La detección de MN por citometría de flujo en RET humanos es una técnica rápida, moderna, eficiente

y con alta sensibilidad, comparada con los análisis convencionales basados en la técnica de linfocitos binucleados y podría constituirse en una nueva herramienta que puede validar este biomarcador para predecir y detectar tempranamente el cáncer.

INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH) COMO MEDIDA DE INESTABILIDAD

En las células mitóticas el ADN, previamente duplicado en la fase S del ciclo celular, se condensa y forma dos copias de cada cromosoma unidas por el centrómero. Cada cromosoma está conformado por dos cromátidas hermanas idénticas (Wilson y Thompson 2007), en las cuáles puede ocurrir recombinación somática por ruptura y reunión de las cadenas de ADN generando un ICH. Las evidencias encontradas por Wilson y colaboradores (2007) indican que cada ICH es el resultado de un evento reparativo generado por defectos post-replicativos, alquilaciones, ligamentos cruzados y los mecanismos de reparación asociados con ellos, mediados por la estructura de Holliday. Por lo anterior, un ICH se considera una manifestación citológica de un evento de reparación del ADN y puede detectarse por métodos de marcaje del ADN durante su replicación, usualmente con bromo-2-deoxi-uridina (*BrdU*), análogo de la timidina (Kaina 2004; Wilson y Thompson 2007).

Considerando que los ICHs representan una manifestación de recombinación homóloga post-replicativa, teóricamente no existe pérdida de material genético, ni cambios en la morfología cromosómica por lo cual no se consideran letales para la célula, no generan mutaciones si la reparación es correcta y tampoco producen cambios en la información genética (Wilson y Thompson 2007; Lim et al. 2014a).

Algunos quimioterapéuticos, como los agentes alquilantes, inducen DSB los cuales son altamente perjudiciales para la integridad estructural de los cromosomas. Para contrarrestar este daño, las células cancerosas inician la respuesta de daño del ADN, donde los DSBs son detectados por el complejo MRN (Mre11, Rad50 y Nbs1), que se traslada rápidamente al lugar del daño y recluta a Ataxia-Telangiectasia mutada, resultando en una cascada de fosforilación que termina con la detención temporal del ciclo celular y la reparación del ADN, generando un aumento

de los niveles de ICH en la célula (Haglund et al. 1980; Tokuda y Bodell 1988).

Inicialmente, la cuantificación de ICHs sirvió para establecer que el efecto de la quimioterapia es bioacumulativo y persistente, ya que se determinó la presencia de ICH nueve meses después de la culminación del tratamiento en muestras de sangre de niños con linfomas malignos (Haglund et al. 1980). Otros estudios analizaron el efecto en la inducción de ICH con bajas concentraciones de quimioterapéuticos como alquilantes, antibióticos, antitumorales, productos naturales y antimetabolitos, lo cual muestra que la técnica de ICH es muy sensible para detectar genotoxicidad potencial (Banerjee y Benedict 1979; Tokuda y Bodell 1988).

Desafortunadamente, los GBM son particularmente resistentes al tratamiento convencional STUPP, generando recurrencia de los tumores cerebrales, así que la resistencia a la TMZ se puede determinar por el aumento en el número de ICH en pacientes (Gil Del Alcazar et al. 2016). La falta de respuesta al tratamiento de estos tumores, podría deberse principalmente a factores intrínsecos, como fallas en la recombinación homóloga, anomalías en el punto de control del ciclo celular y de resistencia adquirida de los tumores al fármaco (Lim et al. 2012; Lim et al. 2014b; Gil Del Alcazar et al. 2016).

Esta técnica tiene varias ventajas, como la detección inicial y sensible de la acción directa o indirecta de mutágenos químicos, los cuales producen aductos del ADN; además, se puede realizar *in vitro* e *in vivo* (en diferentes tejidos) y es reproducible. Como desventajas presenta discrepancia en la relación con su significancia biológica, pues no existe una correlación entre el número de ICH con el número de lesiones sobre el ADN, además hay que sumarle el efecto sinérgico que puede tener el BrdU con los mutágenos analizados.

CONCLUSIONES

Estas tres pruebas podrían evaluar el tipo de daño generado en la célula al inferir el mecanismo de reparación activado para restaurarlo, así: los MN en células binucleadas y los MN-RT resultan de

eventos clastogénicos recientes asociados con los DSB generados por la RT o por el efecto post-replicativo de aductos, ambos cuantificados en tipos de células diferentes, reticulocitos y linfocitos, respectivamente; y los ICHs están asociados a la reparación post-replicativa que generan los aductos alquilantes producto de la quimioterapia con TMZ. Dada la facilidad de las técnicas empleadas para evaluar la reparación del ADN, es muy factible y económico su empleo como posible biomarcador, al compararlo con otro tipo de técnicas moleculares; además, las tres técnicas podrían ser complementarias y dar un panorama completo sobre la inestabilidad genética de los pacientes. Los resultados obtenidos de futuras investigaciones podrían evidenciar que la supervivencia del paciente está correlacionada con el aumento de esta inestabilidad.

Sin embargo, la investigación de biomarcadores en gliomas de alto grado es todo un reto, dada la rareza y la diversidad genética de estos tumores. Por esta razón es necesario continuar con la captación y el estudio sistemático de nuevos pacientes y el diseño de nuevas estrategias para la detección temprana de la enfermedad, a partir de biomarcadores genéticos específicos como el caso de la reparación del ADN, que actúen como herramientas útiles para el monitoreo y/o análisis de la historia natural de la enfermedad.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

- Alentorn A, Duran-Peña A, Pingle SC, Piccioni DE, Idubai A, Kesari S. 2015. Molecular profiling of gliomas: potential therapeutic implications. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 15(8): 955-962. doi:10.1586/14737140.2015.1062368.
- Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, de Sá Júnior PL, Nozima BHN, Ito ET, de Carvalho RF, de Souza EB, de Cassia Stocco R. 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 72: 7482. doi:10.1016/j.biopha.2015.04.004.
- Balaña C, Cardona AF. 2008. Bevacizumab en gliomas de alto grado recurrentes: reporte de un caso y revisión de la literatura. *Revista Colombiana de Oncología*, 12(1): 37-42. <https://www.cancer.gov.co/images/revistas/2008/volumen1/6.%20Resumen.pdf>
- Balmus G, Karp NA, Ng BL, Jackson SP, Adams DJ, McIntyre RE. 2015. A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. *Nature Protocols*, 10(1): 205215. doi:10.1038/nprot.2015.010. [fecha de acceso mayo 15, 2019]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4806852/>.
- Banerjee A, Benedict WF. 1979. Production of sister chromatid exchanges by various cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Research*, 39(3): 797-799. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/39/3/797.full-text.pdf>.
- Barrera LM, Ortiz LD, Grisales H, Rojas M, Camargo M. 2018. Citometría de flujo en reticulocitos de sangre periférica como indicador de inestabilidad cromosómica en pacientes con gliomas de alto grado. 1. *Biomédica*, 38(3): 379-387. doi:10.7705/biomedica.v38i4.3882.
- Begg AC, Stewart FA, Vens C. 2011. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature Reviews Cancer*, 11(4): 239-253. doi:10.1038/nrc3007.
- Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. 2012. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 108(1): 11-27. doi:10.1007/s11060-011-0793-0. [fecha de acceso noviembre 5, 2019]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3337398/>.
- Bloching M, Hofmann A, Lautenschläger C, Berghaus A, Grummt T. 2000. Exfoliative cytology of normal buccal to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncology*, 36: 550-555. doi:10.1016/S1368-8375(00)00051-8.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, et al. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3): 625-631. doi:10.1093/carcin/bgl177.
- Brandes AA, Nicolardi L, Tosoni A, Gardiman M, Iuzzolino P, Ghimenton C, Reni M, Rotilio A, Sotti G, Ermani M. 2006. Survival following adjuvant PCV or temozolomide for anaplastic astrocytoma. *Neuro-Oncology*, 8(3): 253-260. doi:10.1215/15228517-2006-005. [fecha de acceso mayo 15, 2019]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1871946/>.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR, Cooper LAD, Rheinbay E, Miller CR, Vitucci M, et al. 2015. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *The New England Journal of Medicine*, 372(26): 2481-2498. doi:10.1056/NEJMoa1402121.
- Chang P, Li Y, Li D. 2011. Micronuclei levels in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker for pancreatic cancer risk. *Carcinogenesis*, 32(2): 210-215. doi:10.1093/carcin/bgq247.
- Chen Y, Tsai Y, Nowak I, Wang N, Hyrien O, Wilkins R, Ferrarotto C, Sun H, Dertinger SD. 2010. Validating high-throughput micronucleus analysis of peripheral reticulocytes for radiation biodosimetry: benchmark against dicentric and CBMN assays in a mouse model. *Health Physics*, 98(2): 218-227. doi:10.1097/HP.0b013e3181abaae5.
- Cohen AL, Colman H. 2015. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treatment and Research*, 163: 1530-1542. doi:10.1007/978-3-319-12048-5_2.
- Dertinger SD, Miller RK, Brewer K, Smudzin T, Torous

- DK, Roberts DJ, Avlasevich SL, Bryce SM, Sugunan S, Chen Y. 2007a. Automated Human Blood Micronucleated Reticulocyte Measurements for Rapid Assessment of Chromosomal Damage. *Mutation Research*, 626(12): 111119. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.09.003. [fecha de acceso mayo 15, 2019]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1796663/>.
- Dertinger SD, Miller RK, Brewer K, Smudzin T, Torous DK, Roberts DJ, Avlasevich SL, Bryce SM, Sugunan S, Chen Y. 2007b. Automated Human Blood Micronucleated Reticulocyte Measurements for Rapid Assessment of Chromosomal Damage. *Mutation Research*, 626(12): 111119. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.09.003. [fecha de acceso mayo 15, 2019]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1796663/>.
- Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, Pekmezci M, Rice T, Kosel ML, Smirnov IV, Sarkar G, Caron AA, Kollmeyer TM, Praska CE, Chada AR, Halder C, Hansen HM, McCoy LS, Bracci PM, Marshall R, Zheng S, Reis GF, Pico AR, O'Neill BP, Buckner JC, Giannini C, Huse JT, Perry A, Tihan T, Berger MS, Chang SM, Prados MD, Wiemels J, Wiencke JK, Wrensch MR, Jenkins RB. 2015. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *The New England Journal of Medicine*, 372(26): 24992508. doi:10.1056/NEJMoa1407279.
- Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert M, Steiger H-J, Friedensdorf B, Reifenberger G, Sabel MC. 2009. Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clinical Cancer Research*, 15(21): 66836693. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2801.
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. 1999. The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 428(12): 271283.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan A, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1): 125-32. doi:10.1093/mutage/geq052
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5): E359-386. doi:10.1002/ijc.29210.
- Galia A, Calogero AE, Condorelli R, Frassetto F, La Corte A, Ridolfo F, Bosco P, Castiglione R, Salemi M. 2012. PARP-1 protein expression in glioblastoma multiforme. *European Journal of Histochemistry*, 56(1): e9. doi:10.4081/ejh.2012.e9.
- Gil Del Alcazar CR, Todorova PK, Habib AA, Mukherjee B, Burma S. 2016. Augmented HR Repair Mediates Acquired Temozolomide Resistance in Glioblastoma. *Mol Cancer Research*, 14(10): 928940. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0125.
- Guan X, Vengoechea J, Zheng S, Sloan AE, Chen Y, Brat DJ, O'Neill BP, de Groot J, Yust-Katz S, Yung W-KA, Cohen ML, Aldape KD, Rosenfeld S, Verhaak RG, Barnholtz-Sloan JS. 2014. Molecular subtypes of glioblastoma are relevant to lower grade glioma. *PLoS ONE*, 9(3): e91216. doi:10.1371/journal.pone.0091216.
- Haglund U, Hayder S, Zech L. 1980. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in children after treatment for malignant lymphoma. *Cancer Research*, 40(12): 47864790.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, Schramm J, Schnell O, Seidel C, Stein R, Reifenberger G, Pietsch T, von Deimling A, et al. 2011. Molecular markers in low-grade gliomas: predictive or prognostic? *Clinical Cancer Research*, 17(13): 45884599. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3194.
- International agency of research on cancer. 2018. All cancers. World health organization. [fecha de acceso noviembre 5, 2019]. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>.
- Javle M, Curtin NJ. 2011. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *British Journal of Cancer*, 105(8): 11141122. doi:10.1038/bjc.2011.382.
- Kaina B. 2004. Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. *Cytogenet Genome Research*, 104(14): 7786. doi:10.1159/000077469.
- Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G, German Glioma Network. 2007. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*, 130(Pt 10): 25962606. doi:10.1093/brain/awm204.
- Lim YC, Roberts TL, Day BW, Harding A, Kozlov S, Kijas AW, Ensby KS, Walker DG, Lavin MF. 2012. A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(9): 18631872. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-1044.
- Lim YC, Roberts TL, Day BW, Stringer BW, Kozlov S, Fazry S, Bruce ZC, Ensby KS, Walker DG, Boyd AW, et al. 2014. Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells. *Molecular Oncology*, 8(8): 16031615. doi:10.1016/j.molonc.2014.06.012.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2): 97109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4. [fecha de acceso septiembre 28, 2019]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1929165/>.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6): 803820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
- Marumoto T, Saya H. 2012. Molecular biology of glioma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 746: 211.

- doi:10.1007/978-1-4614-3146-6_1.
- Mellai M, Caldera V, Annovazzi L, Chiò A, Lanotte M, Cassoni P, Finocchiaro G, Schiffer D. 2009. MGMT promoter hypermethylation in a series of 104 glioblastomas. *Cancer Genomics Proteomics*, 6(4): 219227.
- Minniti G, Enrici RM. 2014. Radiation therapy for older adults with glioblastoma: radical treatment, palliative treatment, or no treatment at all? *Journal of Neuro-Oncology*, 120(2): 225233. doi:10.1007/s11060-014-1566-3.
- Mittal S, Pradhan S, Srivastava T. 2015. Recent advances in targeted therapy for glioblastoma. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(8): 935946. doi:10.1586/14737175.2015.1061934.
- Mullard A. 2014. Learning from exceptional drug responders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(6): 401402. doi:10.1038/nrd4338.
- Murgia E, Ballardini M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. 2008. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutation Research*, 639(12): 2734. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.10.010.
- Olar A, Sulman EP. 2015. Molecular Markers in Low Grade Glioma – Toward Tumor Reclassification. *Seminars in Radiation Oncology*, 25(3): 155163. doi:10.1016/j.semradonc.2015.02.006 [fecha de acceso noviembre 5, 2019]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4500036/>.
- Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, et al. 2014. The epidemiology of glioma in adults: a state of the science review. *Neuro-oncology*, 16(7): 896913. doi:10.1093/neuonc/nou087.
- Pace A, Dirven L, Koekkoek JAF, Golla H, Fleming J, Rudà R, Marosi C, Le Rhun E, Grant R, Oliver K, et al. 2017. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guidelines for palliative care in adults with glioma. *The Lancet Oncology*, 18(6): e330e340. doi:10.1016/S1470-2045(17)30345-5.
- Pardo C, de Vries E. 2017. Supervivencia global de pacientes con cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología (INC). *Revista Colombiana de Cancerología*, 21(1): 1218. doi:10.1016/j.rccan.2017.01.003. [fecha de acceso septiembre 28, 2019]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0123901517300082>.
- Piñeros M, Sierra MS, Izarzugaza MI, Forman D. 2016. Descriptive epidemiology of brain and central nervous system cancers in Central and South America. *Cancer Epidemiology*, 44 Suppl 1: S141S149. doi:10.1016/j.canep.2016.04.007.
- Quiros S, Roos WP, Kaina B. 2011. Rad51 and BRCA2–New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs. *PLoS ONE*, 6(11): e27183. doi:10.1371/journal.pone.0027183.
- Ranjit M, Motomura K, Ohka F, Wakabayashi T, Natsume A. 2015. Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma. *Brain Tumor Pathology*, 32(3): 153162. doi:10.1007/s10014-015-0224-6.
- Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Naumann SC, Kiedron O, Zdzienicka MZ, Kaina B. 2009. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst)*, 8(1): 7286. doi:10.1016/j.dnarep.2008.09.003.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31(1): 915. doi:10.1016/0165-1161(75)90058-8
- Sheridan C. 2014. Cancer centers zero in on exceptional responders. *Nature Biotechnology*, 32(8): 703704. doi:10.1038/nbt0814-703.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 2009. 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. *The Lancet Oncology*, 10(5): 459466. doi:10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10): 987996. doi:10.1056/NEJMoa043330.
- Takahashi Y, Nakamura H, Makino K, Hide T, Muta D, Kamada H, Kuratsu J-I. 2013. Prognostic value of isocitrate dehydrogenase 1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation, and 1p19q co-deletion in Japanese malignant glioma patients. *World Journal of Surgical Oncology*, 11: 284. doi:10.1186/1477-7819-11-284.
- Tokuda K, Bodell WJ. 1988. Cytotoxicity and induction of sister chromatid exchanges in human and rodent brain tumor cells treated with alkylating chemotherapeutic agents. *Cancer Research*, 48(11): 31003105. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/48/11/3100.full.pdf>
- Wang J, Su H, Zhao H, Chen Z, To ST. 2015. Progress in the application of molecular biomarkers in gliomas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465(1): 14. doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.148.
- Wilson DM, Thompson LH. 2007. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research*, 616(12): 1123. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017.