



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Diseño y validación de métodos para identificar
tres biomarcadores de gliomas**

Tesis que presenta

Argenis Fernando Alvarez Guerrero

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis

Dr. Rubén López Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., Junio de 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Diseño y validación de métodos para identificar tres biomarcadores de gliomas**”. presentada para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Argenis Fernando Álvarez Guerrero** y aprobada el **01 de junio de 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén López Revilla
Director de la tesis

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Asesora interna

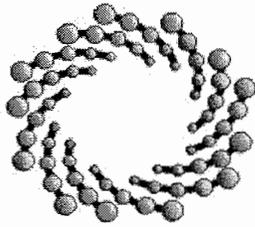
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Asesor externo



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 931854) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 218 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 18 días del mes de junio del año 2021, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|--|-------------------|---------------|
| Dra. Lina Raquel Riego Ruiz | Presidenta | IPICYT |
| Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga | Secretario | IPICYT |
| Dr. Rubén Hipólito López Revilla | Sinodal | IPICYT |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Argenis Fernando Alvarez Guerrero

sobre la Tesis intitulada:

Diseño y validación de métodos para identificar tres biomarcadores de gliomas

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 18 días del mes de junio de 2021.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

Este trabajo está dedicado a todas las personas que lo han hecho posible; aquellos que me permitieron recordar en cada momento quien soy cuando perdía la fe en mí y aquellos que brindándome su fortaleza me recordaron la que hay dentro de mí.

A mis padres por su amor, entrega y apoyo incondicional; no sé qué haría sin ustedes, los amo:

Gracias a mi súper papá Fernando Alvarez, por ser ese ejemplo de fortaleza e ímpetu para mí; sé que siempre puedo contar contigo.

A mis hermosas mamás Lilia Natalia Guerrero (QEPD) y Dafne Cristina Vega, por impulsarme siempre a abrir mis alas, permitiéndome conocer quién soy y todo lo que puedo lograr con su ejemplo de amor incondicional e inteligencia.

A mi hermana Ma. de los Ángeles Alvarez, mi amore; gracias por tanto amor, complicidad, risas y pato aventuras juntos, siempre echándome porras en los momentos en que tanto lo necesitaba.

A mis mejores amigos Carlos Uribe e Iván Alberto Fernández por ser siempre ese apoyo y amor incondicional. Cuando siento que ya no puedo más son mi motor para seguir adelante y, más mis amigos, son mis hermanos; sin duda estoy muy emocionado en esta nueva etapa que nos aguarda juntos y todas las aventuras que vienen con ella.

A mis profesores, personal del IPICYT y, por supuesto, a mi hermosa familia de laboratorio, el increíble LAB3. Sin ellos no sé qué hubiera sido de mí todos estos años. Gracias por ser ese soporte, motor y guía durante toda esta hermosa etapa que sin duda lo maravilloso en gran parte se los debo a ustedes, no solo en el ámbito profesional si no en lo personal me ayudaron siempre a dar lo mejor de mí. Saben cuánto los quiero y siempre estaré agradecido con ustedes.

Y por supuesto no podían faltar todas mis potosí-amistades que he encontrado en el camino desde el inicio hasta la culminación de este viaje, que si me pongo a nombrarlos no alcanzaría las páginas de la tesis. GRACIAS.

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT la beca que me otorgó.

Al IPICYT por permitirme ser parte del programa de maestría y por el apoyo otorgado durante mis años de estudiante.

Al Dr. Rubén López Revilla, por abrirme las puertas de su laboratorio y desarrollar mi investigación en este proyecto.

A la Dra. Angélica Montoya Contreras, la Biol. Mireya Guadalupe Sánchez Garza, el Dr. Víctor Sanabria Ayala y al M. en C. Guillermo Pettet Ruíz, por su invaluable asesoría técnica, fundamental para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Mónica Sierra y el M. en C. Isaías Eduardo Hernández Verdín, pioneros de este proyecto, por permitirme ser participe y desarrollador de este trabajo para la obtención de mi grado.

Contenido

| | |
|--|-------------|
| Constancia de aprobación de la tesi | ii |
| Créditos institucionales | iii |
| Dedicatorias | v |
| Agradecimientos | vi |
| Lista de tablas | ix |
| Lista de figuras | x |
| Abreviaturas | xi |
| Resumen | xiii |
| Abstract | xiv |
| Introducción | 1 |
| Tumores del sistema nervioso central | 1 |
| Gliomas | 1 |
| Clasificación histopatológica de los gliomas | 2 |
| Biomarcadores para la reclasificación de gliomas | 6 |
| Polimorfismos de <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> | 9 |
| La codeleción 1p/19q | 11 |
| <i>Impacto de la codeleción 1p/19q en el diagnóstico</i> | 12 |
| Metilación del promotor <i>MGMT</i> | 13 |
| <i>El gen MGMT</i> | 13 |
| <i>Metilación del ADN</i> | 13 |
| <i>Impacto de la metilación del promotor MGMT en el diagnóstico de gliomas</i> | 15 |
| <i>Modificación del ADN con bisulfito de sodio (BisNa)</i> | 16 |
| Justificación | 17 |
| Objetivos | 17 |
| Material y métodos | 18 |
| Obtención del ADN de la sangre y biopsias de los pacientes con gliomas | 18 |
| <i>Fijación, transporte y preservación de los fragmentos de biopsia</i> | 18 |
| <i>Homogenización de los fragmentos de biopsias</i> | 18 |
| <i>Proteólisis</i> | 19 |
| <i>Extracción de contaminantes hidrofóbicos o anfipáticos</i> | 19 |
| <i>Precipitación de contaminantes de la fase acuosa</i> | 19 |
| <i>Precipitación y lavado del ADN</i> | 19 |
| <i>Eliminación del EtOH del ADN lavado</i> | 20 |
| <i>Disolución del ADN purificado</i> | 20 |
| <i>Concentración y pureza del ADN</i> | 20 |
| Polimorfismos de <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> | 20 |
| <i>Diseño de iniciadores</i> | 20 |
| <i>Optimización de la PCR</i> | 22 |
| <i>Programas de termociclado IDH1, IDH2, Codeleción 1p/19q y MGMT</i> | 22 |
| <i>PCR IDH1</i> | 22 |
| <i>PCR IDH2</i> | 23 |
| <i>Electroforesis en geles SB-agarosa al 2%</i> | 23 |
| <i>Purificación de los amplicones IDH1 e IDH2</i> | 23 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Secuenciación y análisis de los amplicones IDH1 e IDH2</i> | 24 |
| Codeleción 1p/19q | 24 |
| <i>Diseño de iniciadores</i> | 24 |
| <i>PCR de los amplicones E2F2, NOTCH2, PLAUR, y GLTSCR2</i> | 24 |
| <i>Electroforesis en geles SB-agarosa al 2%</i> | 25 |
| Estado de metilación del promotor <i>MGMT</i> | 25 |
| <i>Diseño de iniciadores</i> | 25 |
| <i>Concentración y desnaturalización del ADN</i> | 25 |
| <i>Conversión de residuos de citosina a uracilo</i> | 26 |
| <i>Purificación del ADN modificado con nanopartículas superparamagnéticas recubiertas de sílica</i> | 26 |
| <i>Desulfonación de los residuos de uracilo</i> | 28 |
| <i>Purificación del ADN modificado</i> | 29 |
| <i>Calidad y concentración del ADN modificado</i> | 29 |
| <i>PCR del amplicón MGMT</i> | 29 |
| <i>Electroforesis en geles SB-agarosa al 2%</i> | 30 |
| <i>Purificación de los productos de PCR</i> | 30 |
| <i>Secuenciación y análisis</i> | 30 |
| Resultados | 31 |
| Obtención del ADN de la sangre y las biopsias de los pacientes con gliomas | 31 |
| <i>Extracto crudo de los fragmentos de biopsia</i> | 31 |
| <i>Extracción con cloroformo</i> | 31 |
| <i>Eliminación de contaminantes de la fase acuosa</i> | 31 |
| <i>ADN precipitado</i> | 31 |
| <i>ADN lavado</i> | 31 |
| <i>Pureza y rendimiento del ADN</i> | 32 |
| Identificación de los polimorfismos de <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> | 35 |
| Codeleción 1p/19q | 41 |
| Metilación del promotor <i>MGMT</i> | 44 |
| <i>Amplificación de la región de interés</i> | 44 |
| <i>Rendimiento de los amplicones MGMT</i> | 44 |
| <i>Rendimiento del ADN modificado del amplicón MGMT</i> | 44 |
| <i>Secuenciación y análisis</i> | 45 |
| Discusión | 47 |
| Referencias | 49 |
| Anexo. Secuencias de los amplicones | 54 |
| Amplicones <i>IDH1</i> | 54 |
| Amplicones <i>IDH2</i> | 55 |
| Amplicones <i>MGMT</i> | 56 |
| Artículo de revisión publicado | 57 |
| Álvarez-Guerrero AF, López-Revilla R (2021) | 57 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Iniciadores empleados para generar los amplicones IDH1, IDH2, E2F2, NOTCH2, PLAU, GLTSCR2 y MGMT | 21 |
| Tabla 2. Mezclas individuales de PCR para todos los amplicones | 22 |
| Tabla 3. Programa de termociclado PreBisNa | 25 |
| Tabla 4. Programa de termociclado BisNa | 26 |
| Tabla 5. Rendimiento del ADN de las muestras de gliomas (100 μ L) y sangre (50 μ L) de los pacientes | 32 |
| Tabla 6. Rendimiento de los amplicones IDH1 e IDH2 generados a partir del ADN de los gliomas y la sangre de los pacientes | 36 |
| Tabla 7. Polimorfismos de los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> identificados en los gliomas | 37 |
| Tabla 8. A_{260}/A_{280} , concentración y rendimiento de los amplicones MGMT generados a partir de ADN de los gliomas (30 μ L) | 44 |
| Tabla 9. Rendimiento del ADN de los amplicones MGMT modificados | 45 |
| Tabla 10. Metilación de las 28 islas CpG de los amplicones MGMT de los gliomas | 45 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Tipos de células gliales y su papel en la estructura neuronal | 3 |
| Figura 2. Incidencia de tumores malignos del sistema nervioso central y tipos histológicos de gliomas | 4 |
| Figura 3. Algoritmo para la tipificación, asignación de grados y clasificación microscópica de gliomas difusos | 5 |
| Figura 4. Algoritmo para la clasificación de gliomas basado en biomarcadores moleculares | 7 |
| Figura 5. Uso de nanopartículas superparamagnéticas (NP-DMA) para purificar el ADN del amplicón MGMT modificado | 28 |
| Figura 6. Fase orgánica, interfase y fase acuosa de los extractos crudos de fragmentos de glioma mezclados con cloroformo | 33 |
| Figura 7. Contaminantes precipitados de la fase acuosa de fragmentos de glioma | 33 |
| Figura 8. Contaminantes de la fase acuosa sedimentados por centrifugación | 34 |
| Figura 9. ADN de la fase acuosa precipitado con isopropanol | 34 |
| Figura 10. Gel de agarosa al 2% con los amplicones IDH1 (194 pb) e IDH2 (187 pb) generados a partir del glioma del paciente VLV | 38 |
| Figura 11. Gel de agarosa al 2% con los amplicones IDH1 (194 pb), generados a partir del ADN de los gliomas y la sangre de los pacientes MAN, RSG y RHC, respectivamente | 39 |
| Figura 12. Gel de agarosa al 2% con los amplicones IDH2 (187 pb), generados a partir del ADN de los gliomas y la sangre de los pacientes MAN, RSG y RHC, respectivamente | 39 |
| Figura 13. Alineamiento de las secuencias de los amplicones IDH1 e IDH2 de los cuatro pacientes | 40 |
| Figura 14. Geles de agarosa al 2% de los amplicones implicados en la codeleción 1p/19q generados a partir de la sangre de los pacientes | 42 |
| Figura 15. Geles de agarosa al 2% de los amplicones implicados en la codeleción 1p/19q, generados a partir del ADN de los cuatro gliomas | 43 |
| Figura 16. Gel de agarosa al 2% de los amplicones MGMT generados a partir de los gliomas | 46 |

Abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| 1p/19q | Brazo corto (p) cromosoma 1/brazo largo (q) cromosoma 19 |
| 2-HG | 2-hidroxiglutarato |
| 5mC | 5-metil-citosina |
| BisNa | Bisulfito de sodio |
| <i>E2F2</i> | Gen del factor de transcripción E2F2 (en 1p36.12) |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EtBr | Bromuro de etidio |
| EtOH | Etanol |
| GBM | Glioblastoma multiforme |
| <i>GLTSCR2</i> | Gen candidato a supresor de tumores gliales (en 19q13.33) |
| GpC | Isla de bases guanina-citosina |
| HIF1 α | Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia |
| HRAEB | Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío |
| IDH | Isocitrato deshidrogenasa |
| <i>IDH1</i> | Gen de la isocitrato deshidrogenasa 1 |
| IDH1 | Amplicón del gen <i>IDH1</i> |
| <i>IDH2</i> | Gen de la isocitrato deshidrogenasa 2 |
| IDH2 | Amplicón del gen <i>IDH2</i> |
| MGMT | Amplicón del gen de la O ⁶ - Metil-guanín-ADN-metiltransferasa |
| <i>MGMT</i> | Gen O ⁶ - Metil-guanín-ADN-metiltransferasa |
| MS-PCR | PCR específica para metilaciones |
| NADP | Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato |
| NADPH | Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido |
| NOTCH2 | Amplicón de la proteína 2 homóloga de muesca de locus neurogénica |
| <i>NOTCH2</i> | Gen de la proteína 2 homóloga de muesca de locus neurogénica (en 1p12) |
| NP-DMA | Nanopartículas superparamagnéticas recubiertas de sílica |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |

| | |
|--------------|---|
| pb | Par de bases |
| PBS | Solución salina amortiguada con fosfatos |
| <i>PLAUR</i> | Gen del receptor de urocinasa (en 19q13.31) |
| PLAUR | Amplicón del receptor de urocinasa |
| R132H | Cambio de arginina a histidina en el aminoácido 132 de IDH1 |
| R172H | Cambio de arginina a histidina en el aminoácido 172 de IDH2 |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| rs121913499 | SNP correspondiente a la mutación R132H de <i>IDH1</i> |
| rs121913500 | SNP correspondiente a la mutación R132H de <i>IDH1</i> |
| rs121913503 | SNP correspondiente a la mutación R172H de <i>IDH2</i> |
| SB | Borato de sodio |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SNP | Polimorfismo de nucleótido único |
| TCA | Ácido tricarboxílico |
| TE | Tris-EDTA |
| TES | Tris-EDTA-SDS |
| α -KG | Alfa-cetoglutarato |

Resumen

Diseño y validación de métodos para identificar tres biomarcadores de gliomas

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) se deben al crecimiento anormal de las células de los tejidos del encéfalo o la médula espinal y pueden malignizarse y diseminarse por metástasis. Los gliomas son los tumores malignos más frecuentes del SNC y se caracterizan por su heterogeneidad e invasividad. La elevada letalidad de los gliomas se debe, entre otras causas, a la baja eficacia de los tratamientos actuales. La cuarta edición de la clasificación de tumores del SNC de la Organización Mundial de la Salud, publicada en 2016, incluyó por primera vez un criterio basado en la presencia/ausencia de dos marcadores moleculares en los gliomas: la mutación del gen *IDH* y la codeleción 1p/19q cuya identificación mejora el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los gliomas. En México no se ofrecen servicios para identificar los biomarcadores de gliomas. El objetivo de este trabajo fue diseñar los métodos para identificar tres biomarcadores de gliomas: la mutación *IDH1/2*, la codeleción 1p/19q y el estado de metilación del promotor del gen *MGMT*. Una vez montados los métodos, se procesaron fragmentos de biopsias de gliomas de cuatro pacientes mexicanos. Dos gliomas portan polimorfismos de nucleótido único en el gen *IDH1*, uno el clásico con el cambio de arginina a histidina en el codón 132 (R132H) y otro un cambio sinónimo en el codón 146 (GGC146GGT) que no había sido registrado. Los cuatro gliomas portan el alelo *IDH2* silvestre y ninguno tiene la codeleción 1p/19q. Tres gliomas tienen el promotor del gen *MGMT* hipermetilado y uno lo tiene hipometilado. Los métodos desarrollados permitirán identificar los biomarcadores correspondientes para mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de pacientes mexicanos con gliomas.

Palabras clave: Glioma; Biomarcador; Mutación *IDH*; Codeleción 1p/19q; Metilación del promotor *MGMT*.

Abstract

Design and validation of methods to identify three glioma biomarkers

Tumors of the central nervous system (CNS) are caused by the abnormal growth of cells in tissues of the brain or spinal cord that can become malignant and metastasize. Gliomas are the most common malignant CNS tumors and are characterized by their heterogeneity and invasiveness. The high lethality of gliomas is due, among other causes, to the low efficacy of current treatments. The fourth edition of the CNS tumor classification of the World Health Organization, published in 2016, included for the first time a criterion based on the presence/absence of two molecular markers in gliomas: the *IDH* gene mutation, and the 1p/19q codeletion whose identification improves glioma diagnosis, prognosis and treatment. In Mexico, no services are offered to identify glioma biomarkers. The aim of this work was to design the methods to identify three glioma biomarkers: the *IDH1/2* mutation, the 1p/19q codeletion, and the status of the *MGMT* gene promoter methylation. Once the methods were set up, glioma biopsy samples from four Mexican patients were processed. Two gliomas carry mutations in the *IDH1* gene, one the classic one with the change from arginine to histidine in codon 132 (R132H), and another a synonymous one in codon 146 (GGC₁₄₆GGT) that had not been registered. All four gliomas carry the *IDH2* wild type allele and none has the 1p/19q codeletion. Three gliomas have the *MGMT* gene promoter hypermethylated and one has it hypomethylated. The methods developed will identify the corresponding biomarkers and improve the diagnosis, prognosis, and treatment of Mexican patients with gliomas.

Keywords: Glioma; Biomarker; *IDH* mutation; 1p/19q codeletion; *MGMT* promoter methylation.

Introducción

Tumores del sistema nervioso central

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) se deben al crecimiento anormal de las células de los tejidos del encéfalo o de la médula espinal, las cuales pueden progresar a la malignidad y diseminarse por metástasis para dar lugar a otros tumores (Reifenberger et al. 2019). Los tumores primarios del SNC conforman un grupo complejo y heterogéneo con amplia diversidad en cuanto al diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Entre los más de 100 tipos histológicos de tumores primarios del SNC los más frecuentes son los encefálicos, pues representan el 85-90% de todos los tumores diagnosticados (Ostrom et al. 2019)

Los tumores primarios del SNC son más frecuentes en los niños entre 0-14 años, pues representan la primera causa de cáncer en este grupo de edad, seguido por la leucemia. En las personas de entre 15-39 años, los tumores primarios de SNC representan la tercera causa de cáncer más frecuente. Por otro lado, las personas de más de 40 años son las menos susceptibles a los tumores primarios del SNC, siendo el cáncer de mama femenino, el de mayor incidencia para ambos grupos (Ostrom et al. 2019).

Los tumores cerebrales primarios más diagnosticados son los meningiomas y los tumores pituitarios, representando el 53.9% de los casos, seguidos por los glioblastomas. Enfocándonos a los tumores primarios malignos del SNC, los más frecuentes son los glioblastomas, los cuales representan el 53.7% de los casos diagnosticados (Ostrom et al. 2019).

Gliomas

Los gliomas son una categoría de tumores primarios malignos del SNC con diversos subtipos de características heterogéneas (Van Bodegraven et al. 2019). Aunque el mecanismo molecular de la formación de los gliomas no es claro (Tuggle y Waters 2015; Wu et al. 2016) se considera que se originan a partir de células gliales progenitoras o células madre con propiedades gliales. Los diferentes tipos de

gliomas reciben el nombre según las células de las que parecen provenir (Wesseling et al. 2011) (Figura 1).

Los gliomas son los tumores malignos más frecuentes del SNC (Figura 2A) y son agresivos principalmente por su invasividad (Cai et al. 2016; Wu et al. 2016a). La ineficacia de los tratamientos para la gran variedad de subtipos de gliomas implica un pronóstico desfavorable para los pacientes (Hu et al. 2016), reflejado en la alta tasa de mortalidad por estos tumores (Wu et al. 2016). La gran mayoría de los gliomas no se diseminan a otras partes del cuerpo sino a otras partes del encéfalo o de la médula espinal (Reifenberger et al. 2019).

El glioblastoma multiforme (GBM) es la forma más severa de los gliomas y es el subtipo más común en este grupo de tumores (Figura 2B). Su alta tasa de mortalidad deriva de la ineficacia de los escasos tratamientos disponibles (Farias-Eisner et al. 2012). Por otra parte, aunque los gliomas de bajo grado tienen una baja tasa de mortalidad, son altamente epileptogénicos y sus crisis convulsivas características impactan drásticamente la calidad de vida de los pacientes (Li et al. 2018).

Clasificación histopatológica de los gliomas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los gliomas como difusos o no difusos. Los gliomas no difusos, tienen patrones de crecimiento circunscritos, y a los difusos se les asignan grados del II al IV según su gravedad (Wesseling y Capper 2018).

En el caso de los gliomas difusos, el diagnóstico basado en las características histológicas comienza con la identificación de la morfología y el tipo celular a partir del cual parecen haberse originado (Figura 3) (Wu et al. 2016). Algunas neoplasias de alto grado tienen comportamientos agresivos, reflejados en el daño celular debido al crecimiento del tumor, lo que hace que el diagnóstico dependa en gran medida de la experiencia del analista (Wesseling y Capper 2018).

La clasificación de la OMS de los gliomas basada solo en las características morfológicas e histológicas es subjetiva e inconsistente, ya que muchos gliomas difusos histológicamente idénticos difieren en la progresión, la respuesta al tratamiento y el resultado (Siegal 2016).

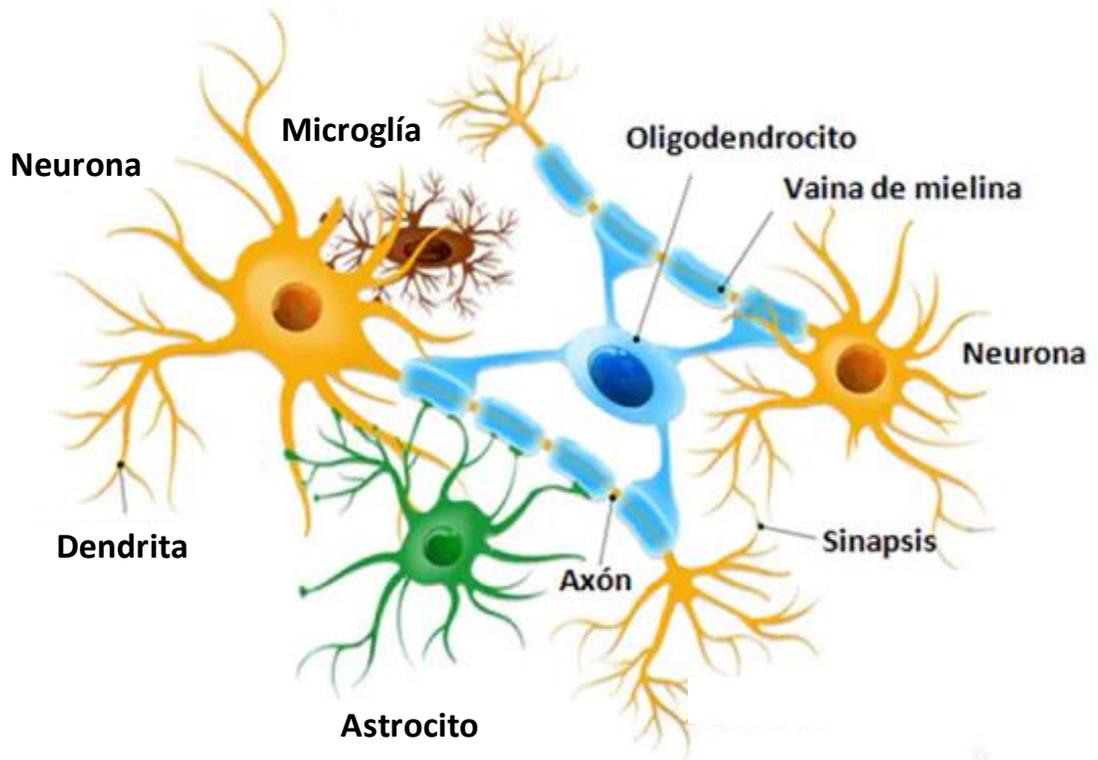


Figura 1. Tipos de células gliales y su papel en la estructura neuronal (LaboLife 2017)

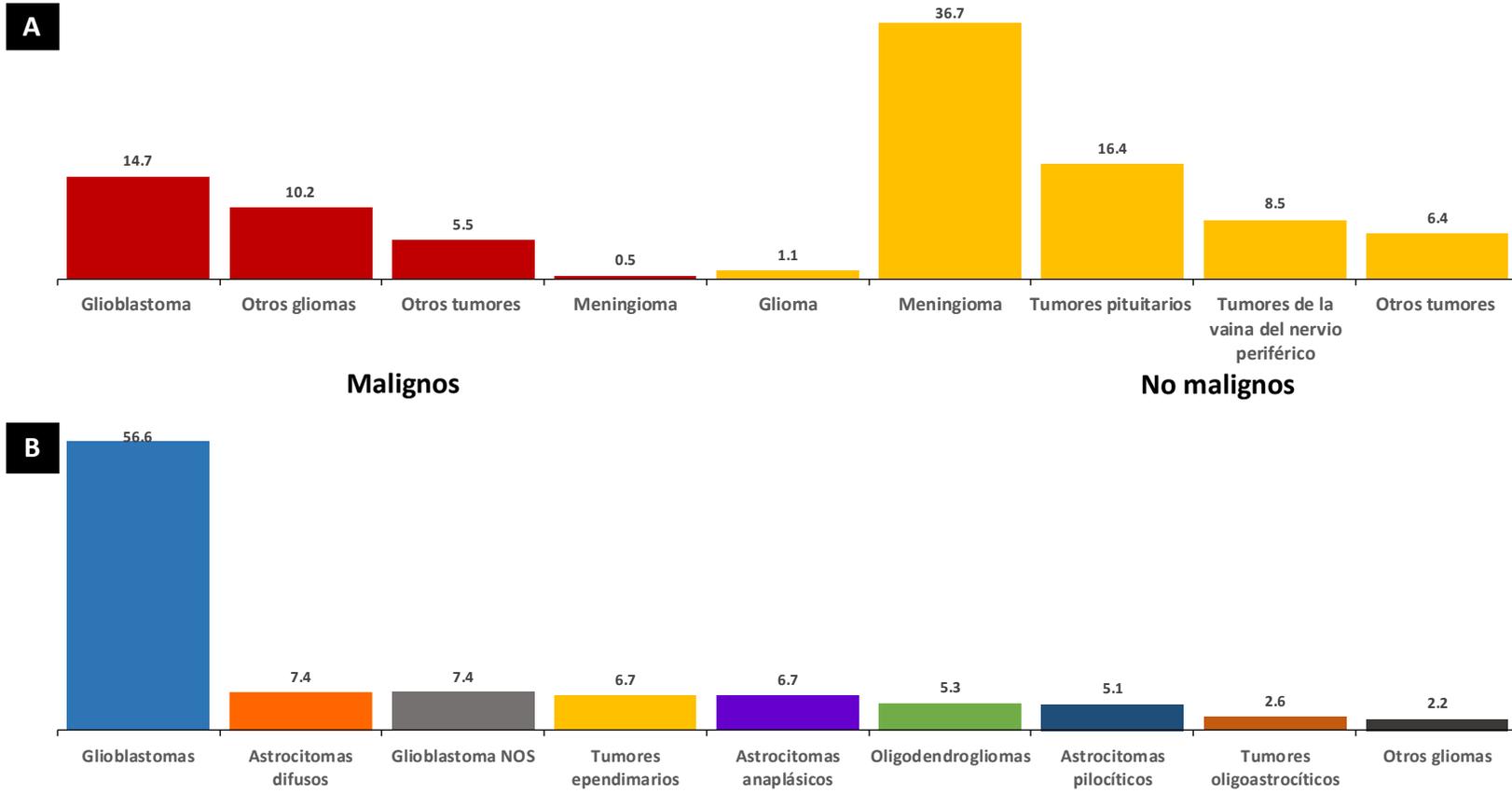


Figura 2. Incidencia de tumores malignos del sistema nervioso central y tipos histológicos de gliomas (A) Incidencia de tumores del SNC; 69.1% no malignos, 30.9% malignos. (B) Tipos histológicos de gliomas (Álvarez-Guerrero y López-Revilla 2021)

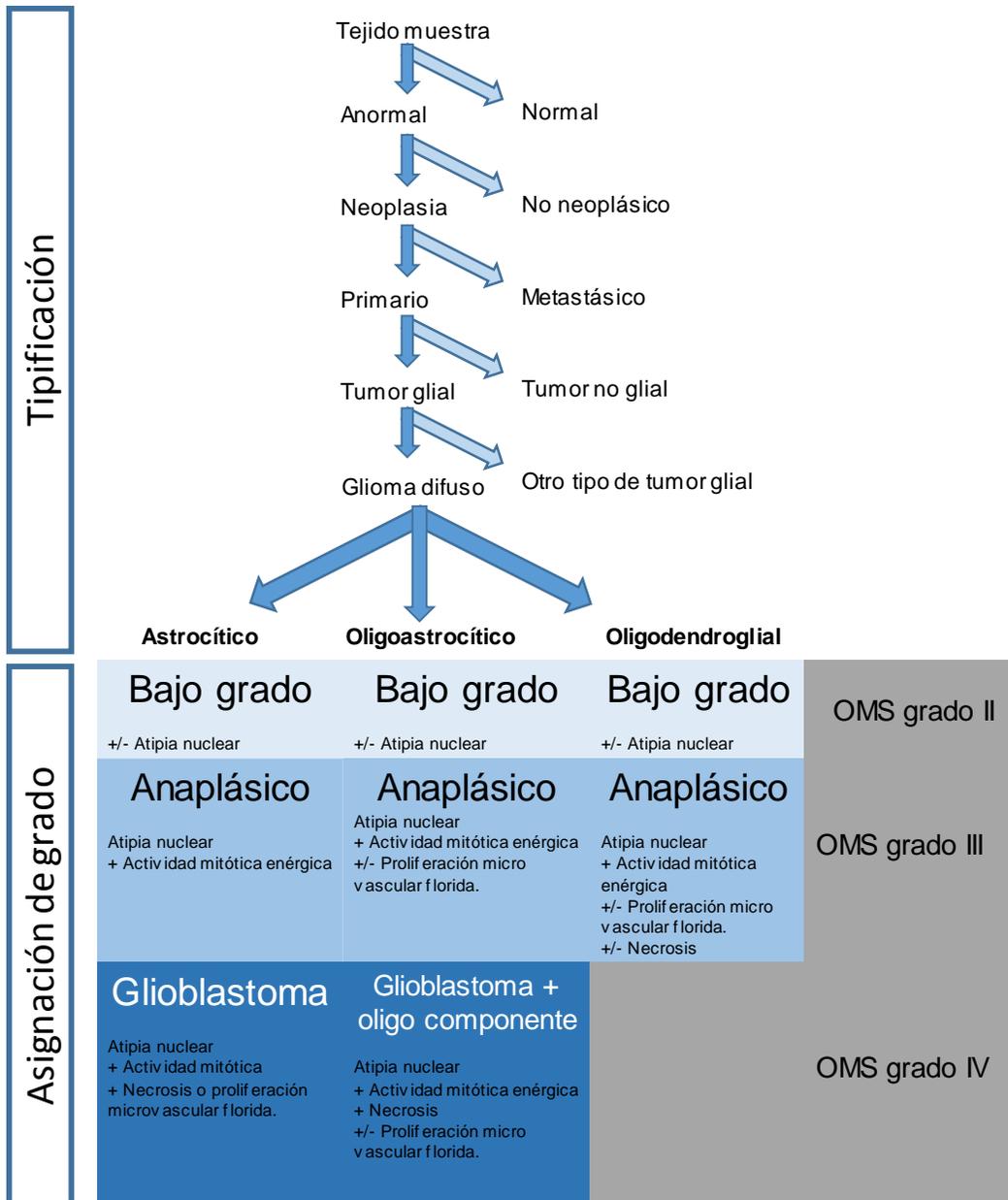


Figura 3. Algoritmo para la tipificación, asignación de grados y clasificación microscópica de gliomas difusos

Árbol de decisiones para la tipificación y clasificación de gliomas por métodos histológicos, incluyendo los criterios microscópicos para la clasificación de gliomas difusos (Álvarez-Guerrero y López-Revilla 2021).

Biomarcadores para la reclasificación de gliomas

Un biomarcador es “una característica que es medida objetivamente y evaluada como indicador de procesos biológicos normales, patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica” (Strimbu y Tavel 2010). Muchos biomarcadores corresponden a características moleculares que brindan información para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades. En el campo de los tumores del SNC, los biomarcadores representan un medio para comprender las rutas moleculares y los mecanismos de desregulación relacionados con estos tumores, e incluso tienen el potencial de extenderse a otros tipos de cáncer (Wu et al. 2016; Yu et al. 2017).

Los avances en la identificación de marcadores moleculares y las tecnologías de procesamiento de imágenes han llevado a una clasificación más precisa que ha mejorado la precisión del diagnóstico y el pronóstico de los tumores del SNC que complementan las características morfológicas e histológicas (Thon et al. 2019). En cuanto a los gliomas, la incorporación de un criterio de clasificación basado en características moleculares de los gliomas sirvió en gran medida para redefinir los subtipos de tumores en la clasificación de la OMS (Siegal 2016; Wesseling y Capper 2018).

La cuarta edición de la clasificación de tumores del SNC de la OMS (Louis et al. 2016) incluyó por primera vez un criterio basado en la presencia/ausencia de dos marcadores moleculares en los gliomas: la mutación del gen *IDH* y la codeleción 1p/19q (Figura 4). Este nuevo criterio ayudó a integrar el pronóstico, las intervenciones quirúrgicas y las múltiples opciones de tratamiento de los gliomas (Thon et al. 2019).

La clasificación de los gliomas basada en las características histológicas es subjetiva e inconsistente, ya que muchos tumores histológicamente idénticos difieren en el desarrollo, la respuesta y el resultado al tratamiento (Wu et al. 2016). Además de su valor diagnóstico, los biomarcadores tumorales del SNC ayudan a comprender las rutas moleculares y los mecanismos de desregulación de los tumores (Yu et al. 2017).

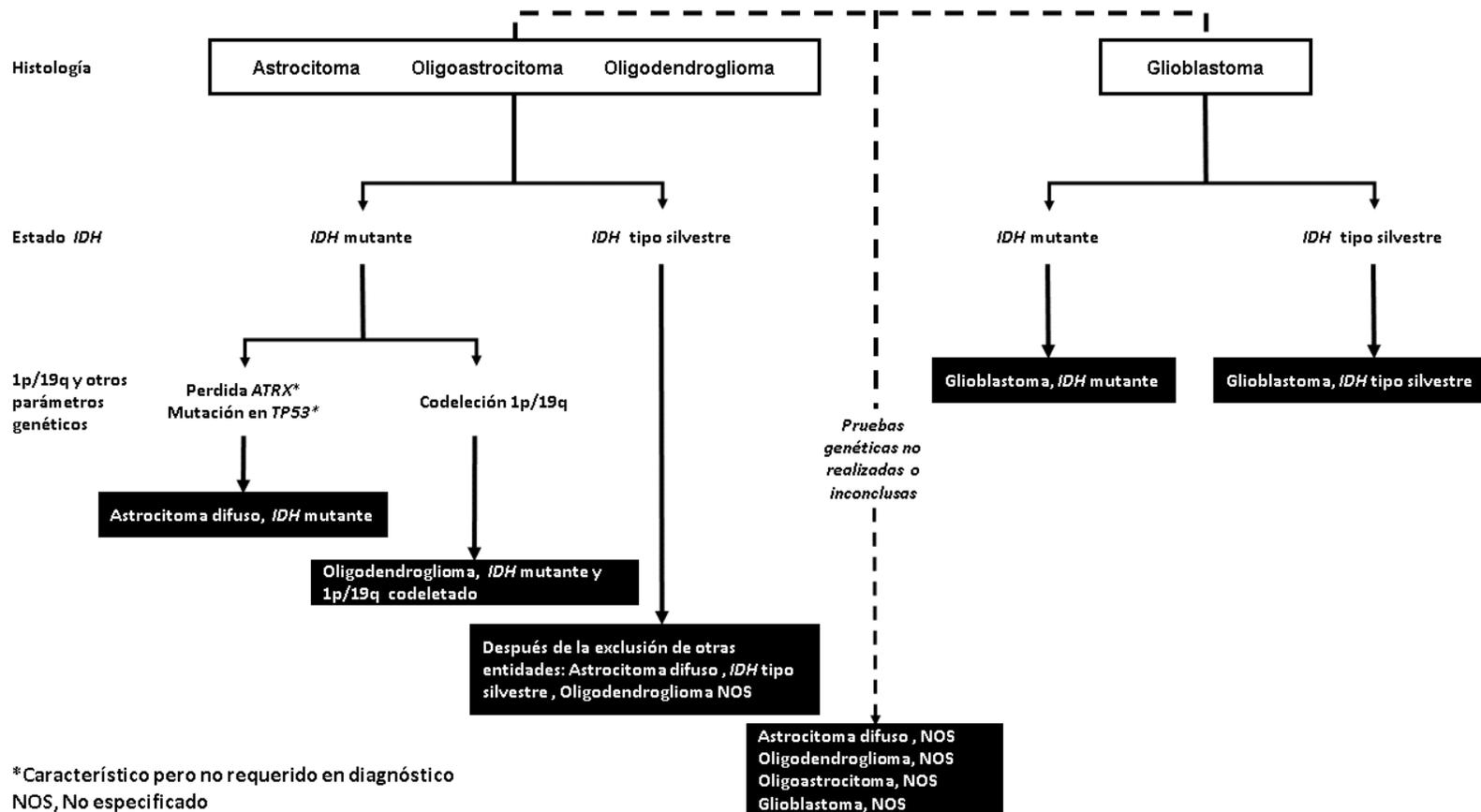


Figura 4. Algoritmo para la clasificación de gliomas basado en biomarcadores moleculares
 La clasificación de gliomas de la Organización Mundial de la Salud utiliza este algoritmo basado en biomarcadores moleculares
 (Álvarez-Guerrero y López-Revilla 2021).

Los gliomas difusos son los tumores cerebrales primarios más frecuentes de los adultos y son en su mayoría astrocíticos (70%) u oligodendrogliales (9%), prácticamente incurables incluso con resección quirúrgica combinada con radioterapia y quimioterapia (Parsons et al. 2008). El glioma pediátrico más común es el astrocitoma pilocítico (grado I de la OMS), mientras que los gliomas difusos se clasifican como de bajo grado (grado II de la OMS) o de alto grado (grados III y IV de la OMS).

El glioblastoma multiforme (GBM) es el glioma más común y letal, con menos de 16 meses de supervivencia. Los GBM primarios surgen *de novo*; los secundarios evolucionan a partir de gliomas de grado II o III y tienen síntomas más prolongados. A pesar de sus diferencias ontológicas, los tumores de alto grado son histológicamente indistinguibles (Nikiforova y Hamilton 2011).

En los gliomas de bajo grado (I y II), un polimorfismo de un solo nucleótido en el codón 132 del gen *IDH1* cambia una arginina a histidina (R132H) en la isoforma de la enzima IDH1, así como en el residuo 172 análogo de la isoforma IDH2. Ambas mutaciones están asociadas a un mejor pronóstico y respuesta terapéutica (Fraser et al. 2018).

Las mutaciones de *IDH1* e *IDH2* se encuentran en astrocitomas, oligodendrogliomas, glioblastomas secundarios y oligoastrocitomas de grado II y III, mientras que los gliomas difusos de grado II y III con genes IDH silvestres tienen características moleculares y comportamiento de glioblastomas (Wesseling y Capper 2018)

La codeleción 1p/18q, debida a una translocación centromérica, se utiliza para distinguir los tumores oligodendrogliales. Ocurre en el 80-90% de los oligodendrogliomas (grado II), en el 60% de los oligodendrogliomas anaplásicos (grado III) y en el 30-50% de los oligoastrocitomas. Los tumores oligodendrogliales con codeleción 1p/19q tienen mejor respuesta a la temozolamida combinada con radioterapia (Nikiforova y Hamilton 2011).

La presencia de mutación *IDH* y codeleción 1p/19q son características de los gliomas difusos de tipo oligodendroglioma. Por el contrario, la mutación *IDH* sin codeleción 1p/19q identifica los astrocitomas (Wesseling y Capper 2018).

El análisis del ADN genómico mediante PCR en tiempo real determina el número de copias de cuatro genes relacionados con la codeleción 1p/19q. *NOTCH2*, ubicado en 1p12, participa en el crecimiento y la diferenciación celular; su pérdida está asociada a mejor pronóstico de oligodendrogliomas y GBM (Boulay et al. 2007). *E2F2*, ubicado en 1p36.12, está involucrado en el crecimiento tumoral; su pérdida está asociada a mejor pronóstico de GBM (Nakahata et al. 2014). *PLAUR*, ubicado en 19q13.31, codifica el receptor de la urocinasa activadora del plasminógeno involucrado en la invasión del glioma (Chaturbedi et al. 2012); su deleción es un factor de pronóstico favorable. *GLTSCR2*, gen candidato a supresor de tumores gliales, se encuentra en 19q13.33; su sobreexpresión induce apoptosis mientras que su represión/deleción promueve el crecimiento tumoral de GBM y es un factor pronóstico negativo (Kim et al. 2008).

El gen *MGMT* codifica la O-6-metilguanina-ADN transferasa (MGMT), enzima que desalquila las guaninas afectadas por agentes alquilantes como la temozolomida y la radioterapia, protege del daño del ADN y previene la muerte celular. La hipermetilación del promotor del gen *MGMT* reduce la expresión y, en consecuencia, aumenta la eficacia de los agentes alquilantes en GBM y gliomas de bajo grado (Everhard et al. 2006).

Polimorfismos de *IDH1* e *IDH2*

Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs, por sus siglas en inglés) son mutaciones correspondientes a cambios de un solo nucleótido en la secuencia de ADN, representan el 90% de los polimorfismos conocidos en la población. Para que una mutación de tipo SNP sea considerada debe presentarse en al menos el 1% de la población (Ramírez-Bello et al. 2013).

Los SNPs son producidos cuando una base sustituye a otra; por ejemplo, una adenina (A) reemplaza a una de las demás bases nucleotídicas: timina (T), citosina (C) o guanina (G) presentes en la secuencia del ADN de un individuo. Estas variaciones son de gran importancia para la diversidad entre los individuos, y pueden conducir a la presencia de fenotipos, rasgos específicos y enfermedades. Los SNPs pueden estar presentes en cualquier región del ADN, codificante o no codificante. Los SNPs en las regiones codificantes pueden resultar en cambios en

la secuencia de aminoácidos o generar un codón de paro que genera una proteína trunca o de función disminuida, lo que puede llevar a patologías asociadas con la proteína afectada.

En el caso de las regiones no codificantes, estudios recientes sugieren que los SNPs regulan los niveles de transcripción génica en lugar de alterar la secuencia codificante de proteínas o la estructura de proteínas. Por lo tanto, los SNPs ubicados en regiones no codificantes, involucradas en la regulación de la expresión génica, podrían estar estrechamente asociados al desarrollo de enfermedades (Sun y col., 2014).

En algunos tipos de tumores, como los gliomas de grado II-III o la leucemia mieloide aguda, es frecuente la aparición de mutaciones somáticas puntuales recurrentes en algunos residuos de IDH1 (Arg132) e IDH2 (Arg172, Arg140).

El gen *IDH* codifica la isocitrato deshidrogenasa (IDH), enzima ampliamente distribuida en el hígado y en los músculos cardíaco y esquelético. La proteína IDH presenta tres isoformas *in vivo* de las cuales dos son dependientes de NADP (IDH1 e IDH2) y una dependiente de NAD (IDH3).

IDH1 está presente en el citoplasma y peroxisoma, manteniendo los procesos del sistema antioxidante *in vivo* y la síntesis lipídica, mientras que, IDH2 e IDH3 se encuentran presentes en la mitocondria.

En general, IDH está involucrada en numerosos procesos celulares, incluyendo la fosforilación oxidativa mitocondrial, el metabolismo de glutamina, la lipogénesis, la sensibilización a la glucosa y la regulación del estado de óxido-reducción celular. IDH cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato a alfa-cetoglutarato (α -KG) y juega un rol importante en la reducción de NADP⁺ a NADPH (Cohen et al. 2013; Salamanca 2020).

Como ya mencionamos, la IDH juega un papel clave en la regulación del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) en múltiples tejidos y está involucrada principalmente en el metabolismo energético celular. Se han identificado mutaciones de *IDH1* e *IDH2* en leucemia mielógena aguda, gliomas de bajo grado y glioblastoma secundario, en tanto que las mutaciones IDH2 no ocurren con frecuencia en glioblastomas.

Parsons et al. (Parsons et al. 2008) encontraron un vínculo entre los gliomas y un SNP en cada gen de las isoformas de *IDH1* e *IDH2* mediante la secuenciación de exones de glioblastoma. Las mutaciones *IDH1/2* son marcadores moleculares tradicionales de gliomas que se deben a los SNPs rs121913499 y rs121913500 del gen *IDH1* y rs121913503 para el gen *IDH2*. En uno de cada cinco tumores el codón 132 del gen *IDH1* correspondiente a arginina (R) cambia al de histidina (H). La mutación *IDH1* R132H es la más común en los gliomas y el gen *IDH2* tiene un cambio análogo en el codón 172 que genera el cambio R172H, cuya frecuencia es relativamente baja en glioblastomas (Parker y Metallo 2015; Siegal 2016; Salamanca 2020).

Las mutaciones *IDH1/2* están presentes en 80-90% de los gliomas de grado II y III; son relativamente independientes y mutuamente excluyentes, con pocos casos de mutaciones simultáneas. Se consideran de “ganancia de función” pues catalizan la conversión de α -KG a D-2-hidroxisuccinato (2-HG). Las proteínas IDH1 mutante y silvestre forman heterodímeros, de forma que el α -KG citosólico se metaboliza a 2-HG. El 2-HG incrementa la proliferación tumoral y la metástasis a través de diferentes mecanismos que implican incremento del estrés oxidativo, metilación del ADN, activación de ciertas vías de señalización, estabilización de HIF1 α o incremento de angiogénesis (Parker y Metallo 2015; Siegal 2016; Salamanca 2020).

La codelección 1p/19q

Los tumores oligodendrogiales presentan frecuentemente pérdida de heterocigocidad en el brazo corto del cromosoma 1 (1p) y el brazo largo del cromosoma 19 (19q), manifestando la codelección de 1p y 19q a través de la pérdida del brazo cromosómico completo, un marcador genético de la mayoría de estos tumores. Dada la alta especificidad de este patrón de codelección, resulta útil como marcador diagnóstico y puede ayudar a diferenciar los oligodendrogliomas de otras neoplasias morfológicamente parecidas (Berrocal 2015).

Las pérdidas de 1p y 19q se detectan hasta en el 90% de los oligodendrogliomas y el 50-70% de oligodendrogliomas anaplásicos, mientras que en el 30-50% de oligoastrocitomas, el 20-30% de gliomas anaplásicos de grado III,

y menos del 10% de los gliomas astrocíticos difusos, incluyendo el glioblastoma multiforme (Berrocal 2015).

Impacto de la codeleción 1p/19q en el diagnóstico

Una correlación notable de los casos con codeleción 1p/19q es la respuesta favorable a la quimioterapia en tumores oligodendrogiales con la codeleción. Tres ensayos clínicos aleatorizados han demostrado que los pacientes con tumores con codeleción 1p/19q viven más tiempo cuando reciben radioterapia o quimioterapia con fármacos alquilantes, o ambas (NIH; Berrocal 2015).

La mediana del tiempo de supervivencia de pacientes con una forma altamente maligna de oligodendroglioma se duplica cuando se añade quimioterapia a la radioterapia; los pacientes la codeleción 1p/19q que reciben ambos tratamientos combinados cuentan con una supervivencia de 14.7 años, en comparación con una mediana de 7.3 años en los que reciben solamente radiación (NIH; Berrocal 2015).

Por otro lado, en los pacientes cuyos tumores tienen solamente una deleción cromosómica (sea 1p o 19q) o ninguna deleción, la supervivencia es similar si reciben solamente radiación que si reciben radiación y quimioterapia: 2.6 años, en comparación con 2.7 años. Actualmente no se considera la codeleción 1p/19q un factor predictivo de respuesta a un tipo específico de terapia, sino que mejora la respuesta terapéutica en general. Los mecanismos de esta mayor sensibilidad terapéutica de los tumores con codeleción 1p/19q no están claros (NIH; Berrocal 2015).

La codeleción 1p/19q se ha evaluado con ensayos basados en PCR o hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Cuando la deleción ocurre es un acontecimiento precoz en la génesis del glioma y puede observarse en la mayoría de las células tumorales, incluso en las de aspecto astrocitario de los oligoastrocitomas, aunque ocurre con mayor frecuencia en tumores con morfología oligodendrogial clásica (NIH; Berrocal 2015).

Metilación del promotor *MGMT*

El gen MGMT

Este gen, localizado en la región 26.3 del brazo q del cromosoma 10, es de aproximadamente 20 kilobases de las que se transcribe un ARN mensajero de 4,678 pb, el cual es traducido en la proteína O⁶-metilguanin-ADN-metiltransferasa (MGMT), cuya función de reparación del ADN participa en la defensa contra la mutagénesis y la toxicidad de agentes alquilantes, que son carcinógenos potentes que provocan mutación, muerte celular y cáncer (NCBI).

La MGMT cataliza la transferencia de grupos metilo de O⁶-alquilguanina y otros restos metilados del ADN a su propia molécula, reparando las lesiones tóxicas. La metilación del promotor de genes, como ya se ha mencionado, ha sido ampliamente asociado con varios tipos de cáncer, incluidos el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón, el linfoma y el glioblastoma (NCBI).

Metilación del ADN

La metilación del ADN en dinucleótidos CpG es uno de los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica. Los patrones de metilación son específicos para cada especie y tipo de tejido. En el genoma de los vertebrados esta modificación epigenética de la molécula del ADN se caracteriza por la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina para generar 5-metilcitosina (5mC). La mayoría de las 5mC en el ADN de mamíferos están presentes en los dinucleótidos 3'CpG5' y en las cadenas complementarias en el dinucleótido GpC. Las secuencias de dinucleótidos metiladas que no corresponden al tipo CpG, como CpNpG, CpA y CpT, son de muy baja frecuencia (Rodríguez-Dorantes et al. 2004).

En células somáticas humanas la 5mC constituye el 1% de las bases del ADN y afecta un alto porcentaje de todos los dinucleótidos CpG en el genoma. La presencia de 5mC produce un cambio conformacional en la cadena doble del ADN, confiriendo una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica. El estado de metilación de los residuos de citosina puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, pues generalmente existe una correlación inversa entre los niveles de

metilación del ADN y la expresión génica (Mesa-Cornejo et al. 2006; Ludwig y Kornblum 2017).

Los dinucleótidos CpG no están distribuidos uniformemente en el genoma humano. En el 98% del genoma están presentes en promedio una vez por cada 80 dinucleótidos, pero existen regiones de 200 pb a varias kilobases que tienen una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG (> 60% de CG), denominadas "islas CpG". El 60-90% de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que no lo están las de las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular. Las islas CpG se localizan generalmente entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, con represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas (Rodríguez-Dorantes et al. 2004; Chen et al. 2017).

El análisis computacional de la secuencia del genoma humano predice la presencia de aproximadamente 29,000 islas CpG, y se ha demostrado que la gran mayoría no están metiladas en todas las etapas del desarrollo, ni en todos los tipos de tejidos. La metilación del ADN constituye un marcador epigenético que identifica la cadena molde durante la replicación del ADN y el origen parental de regiones con impronta regula los transposones, la impronta genómica y la expresión génica. La metilación de elementos reguladores de genes tales como promotores, potenciadores, aislantes y represores generalmente suprime su función. La metilación de regiones no codificantes, como la heterocromatina centromérica, parece crucial para mantener la conformación e integridad de los cromosomas. También se ha sugerido que la metilación constituye un mecanismo de defensa del genoma contra los transposones (Berrocal 2015; Ludwig y Kornblum 2017).

La maquinaria implicada en la metilación comprende diferentes proteínas reguladoras incluyendo las ADN metiltransferasas, las desmetilasas putativas, las proteínas de unión a CpG metiladas, las enzimas modificadoras de histonas y los complejos de remodelación de la cromatina. La metilación del ADN es de vital importancia para mantener el silenciamiento génico en el desarrollo normal, la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X. En contraste, alteraciones de la metilación están implicadas en algunas enfermedades humanas,

especialmente las relacionadas con defectos en el desarrollo y con el proceso neoplásico (Rodríguez-Dorantes et al. 2004; Mesa-Cornejo et al. 2006).

Impacto de la metilación del promotor MGMT en el diagnóstico de gliomas

En general, se considera que la metilación es un proceso unidireccional. Por eso, cuando una secuencia CpG adquiere metilación *de novo*, la modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal. Por otra parte, la pérdida de metilación genómica (hipometilación) como evento primario se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la severidad de la enfermedad (Rodríguez-Dorantes et al. 2004).

Los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y senescentes comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores. Primero, la hipometilación de la heterocromatina conduce a inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; segundo, la hipermetilación de genes individuales; finalmente, la hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes supresores de tumores. Los dos niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o simultánea. En general, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes y la hipometilación con la sobreexpresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis (Chen et al. 2017; Ludwig y Kornblum 2017).

El gen que codifica MGMT, localizado en 10q26, es uno de los marcadores moleculares más estudiados en neurooncología por la asociación entre la hipermetilación del promotor MGMT y la respuesta a los agentes alquilantes. La frecuencia de esta hipermetilación en gliomas varía del 35% al 73% en los glioblastomas, siendo de alrededor del 40% en los primarios y hasta 70% en los secundarios; del 50% al 84% en los astrocitomas difusos de grado III y del 43% al 93% en los astrocitomas difusos de grado II (Berrocal 2015).

Las estrategias metodológicas para el análisis del estado de metilación de las islas CpG han estado en constante evolución y actualmente se cuenta con diversas técnicas que comparten estándares universales, sensibilidad óptima y reproducibilidad. El éxito de la mayoría de los métodos depende de la

transformación química de las citosinas no metiladas a uracilos, por tratamiento con bisulfito de sodio que no afecta la 5mC y marca de forma fidedigna e individual el estado metilado o no metilado de los dinucleótidos CpG. La modificación del ADN, su amplificación por PCR seguida de secuenciación son las técnicas más usadas para este propósito (Berrocal 2015; Chen et al. 2017; Ludwig y Kornblum 2017).

Modificación del ADN con bisulfito de sodio (BisNa)

El estado de metilación del promotor MGMT puede ser probado por PCR-metilación específica (MS-PCR, por sus siglas en inglés), que se basa en la conversión de bisulfito de las citosinas no metiladas en uracilos.

La conversión de bisulfito es el estándar de oro para el análisis de la metilación del ADN pues facilita la identificación y cuantificación de la metilación con resolución de un solo nucleótido. El procedimiento químico de desaminación de citosina por bisulfito de sodio ocurre en tres etapas. La primera etapa es la sulfonación, que consiste en la adición del grupo bisulfito al enlace doble 5-6 de la citosina. La segunda consiste en la desaminación hidrolítica de los derivados citosina-bisulfito para dar paso a un derivado uracilo-bisulfito. La tercera etapa corresponde a la desulfonación alcalina, basada en la eliminación del grupo sulfonato por tratamiento alcalino para dar paso al uracilo. El bisulfito desamina preferentemente citosina a uracilo en ADN de cadena sencilla, mientras que los residuos 5mC no son desaminados por la conversión con bisulfito. Tras la amplificación por PCR, el uracilo se amplifica como timina, en tanto que los residuos 5mC permanecen como citosinas, lo que permite distinguir los nucleótidos CpG metilados de los no metilados por la presencia de una citosina "C" frente a la timina "T" mediante secuenciación (Patterson et al. 2011).

El estado de metilación del promotor MGMT ha sido asociado a la respuesta positiva al tratamiento con agentes alquilantes, como la tezolomida, fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de los gliomas de alto grado (Berrocal 2015; Siegal 2016).

Justificación

El diagnóstico de los gliomas incluye el análisis histopatológico y el análisis de marcadores moleculares. En México únicamente se realiza el diagnóstico histopatológico.

En este trabajo nos propusimos desarrollar los métodos para el análisis de tres biomarcadores básicos de los gliomas –la mutación *IDH1/2*, la codeleción 1p/19q y la metilación del promotor *MGMT*– con la finalidad de poder ofrecerlos para complementar el diagnóstico histopatológico de pacientes con gliomas.

Los avances presentados aquí están enmarcados en la etapa inicial del protocolo de investigación clínica denominado “Firma molecular de gliomas de alto grado en población mexicana en un centro de referencia” (Registro CI/HRAEB/2019/047) propuesto por la Dra. Mónica Sierra, neurooncóloga del Hospital Regional de Alta especialidad del Bajío, y por el M. en C. Isaías Eduardo Hernández Verdin, el cual fue aprobado por los comités de ética e investigación correspondientes el 14 de agosto de 2019.

Objetivos

1. Desarrollar un procedimiento para fijar, preservar, transportar y procesar fragmentos de las biopsias de gliomas resecadas quirúrgicamente.
2. Diseñar y validar métodos moleculares confiables y reproducibles que identifiquen:
 - a. Las mutaciones *IDH1* e *IDH2* relevantes, mediante PCR y secuenciación.
 - b. La codeleción 1p/19q, mediante PCR.
 - c. El estado de metilación del promotor del gen *MGMT*, mediante conversión con bisulfito de sodio, MS-PCR y secuenciación.

Material y métodos

Obtención del ADN de la sangre y biopsias de los pacientes con gliomas

Obtuvimos la sangre venosa y los fragmentos de biopsias de gliomas resecadas quirúrgicamente de cuatro pacientes con gliomas del HRAEB a través de la Dra. Mónica Sierra. Para la extracción del ADN de sangre venosa, usada como control interno, fue empleado el método de nuestro laboratorio (Pettet-Ruiz 2016) el cual adaptamos para la extracción del ADN de los fragmentos de biopsias, como describimos a continuación.

Fijación, transporte y preservación de los fragmentos de biopsia

Los fragmentos de las biopsias fueron introducidos en tubos con tapón de rosca que contenían 2 mL de fijador (PBS-EtOH 95% 1:1). Los fragmentos fijados y almacenados a 4 °C son estables indefinidamente y fueron enviados al laboratorio por paquetería.

Homogenización de los fragmentos de biopsias

Los tamaños aproximados de los fragmentos de las biopsias de los gliomas de cada paciente fueron los siguientes: VLV, 5x5x5 mm; MAN, 5x5x2 mm; RSG, 5x5x5 mm; RHC, 5x5x3 mm.

Para la extracción utilizamos guantes de nitrilo nuevos y limpiamos la zona de trabajo, micropipetas, gradillas y material de trabajo con EtOH técnico al 70%. Tomamos el fragmento de biopsia y lo colocamos dentro de un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

Homogeneizamos cada fragmento con un pistilo para tubo de microcentrífuga limpio y estéril, presionando el fragmento al fondo del tubo y ejerciendo presión con el pistilo. Para obtener el extracto crudo de la biopsia, al homogenado añadimos 550 µL del buffer de lisis, compuesto por 500 µL de TES (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) y 50 µL de SDS al 10%.

Proteólisis

A cada tubo con el extracto crudo añadimos 40 μL de proteinasa K (20 ng/ μL) y agitamos la mezcla con vórtex por 30 s; mantuvimos los tubos hasta el día siguiente en un termoblock a 55 °C.

Extracción de contaminantes hidrofóbicos o anfipáticos

Añadimos 500 μL de cloroformo a cada tubo que luego agitamos en vórtex por 30 s e inmediatamente lo colocamos en la microcentrífuga Gm Lab Gilsodd (Capsulefuge PMC-880) y lo centrifugamos a 13,000 rpm por 15 min.

La centrifugación separó la fase acuosa superior de la fase orgánica inferior; conservamos la fase acuosa, trasvasándola cuidadosamente por aspiración a tubos nuevos de 1.5 mL, cuidando de no acarrear la interfase. Descartamos los tubos con cloroformo en un recipiente para residuos orgánicos.

Precipitación de contaminantes de la fase acuosa

A cada tubo con la fase acuosa añadimos 150 μL de NaCl 5 M y agitamos vigorosamente con la mano hasta observar la formación de espuma. Centrifugamos a 13,000 rpm por 15 min, luego aspiramos cuidadosamente los sobrenadantes y los transferimos a tubos nuevos de 1.5 mL. Descartamos los tubos con residuos orgánicos en un recipiente con Cloralex al 5%.

Precipitación y lavado del ADN

A cada tubo añadimos 500 μL de isopropanol a -20 °C y lo agitamos suavemente por inversión; lo mantuvimos a -20 °C toda la noche y luego lo centrifugamos a 13,000 rpm por 15 min para sedimentar el ADN. Descartamos cuidadosamente el sobrenadante por aspiración y lo depositamos en un recipiente con Cloralex al 5%.

Al tubo con la pastilla de ADN añadimos 700 μL de EtOH al 70% frío, le dimos un pulso de 5 s en el vórtex y lo centrifugamos a 13,000 rpm por 15 min. Cuidando de conservar la pastilla, aspiramos cuidadosamente el sobrenadante y lo descartamos en un recipiente con Cloralex al 5%. Repetimos el lavado de la pastilla dos veces más.

Eliminación del EtOH del ADN lavado

Colocamos los tubos con las pastillas de ADN destapados en el termoblock a 55 °C por 5-10 min, cuidando de no secarlos demasiado.

Disolución del ADN purificado

Disolvimos la pastilla de ADN con 100 µL de TE y dejamos reposar los tubos al menos 30 min a temperatura ambiente y les dimos vórtex por 10 s.

Concentración y pureza del ADN

Para determinar la relación A_{260}/A_{280} y la concentración del ADN utilizamos el espectrofotómetro Epoch (BioTek). Consideramos que el rango aceptable de valores de A_{260}/A_{280} es 1.8-2.0. Sellamos los tubos con ADN puro con Parafilm y los conservamos a -20 °C.

Polimorfismos de *IDH1* e *IDH2*

Diseño de iniciadores

Para el diseño de los iniciadores utilizamos las secuencias de referencia de GenBank (NCBI) NG_023319.2 para *IDH1* y la secuencia NG_023302.1 para *IDH2*. Para la búsqueda de iniciadores que amplificaran las regiones de interés utilizamos el programa PrimerBlast (NCBI).

Una vez seleccionados los posibles iniciadores, los analizamos utilizando la herramienta Oligo Analyzer (IDT gene) para evaluar sus características, especificidad y carencia de estructuras secundarias. Finalmente seleccionamos una pareja de iniciadores para cada gen (Tabla 1).

Tabla 1. Iniciadores empleados para generar los amplicones IDH1, IDH2, E2F2, NOTCH2, PLAUR, GLTSCR2 y MGMT

| Gen | Oligonucleótido | Secuencia 5'-3' | Amplicón (pb) |
|----------------|------------------------|--------------------------|----------------------|
| <i>IDH1</i> | IDH1F | GGTTGAGGAGTTCAAGTTGA | 194 |
| | IDH1R | TCACATTATTGCCAACATGAC | |
| <i>IDH2</i> | IDH2F | GAAGATGTGGAAAAGTCCCAATGG | 187 |
| | IDH2R | GTGCCCAGGTCAGTGGAT | |
| <i>E2F2</i> | E2F2F | GGAGGTTTTCAACAAACATTGA | 124 |
| | E2F2R | ACCGACCCTAGCATCATG | |
| <i>NOTCH2</i> | NOTCH2F | TGTCTGCTCACCAGGATTC | 72 |
| | NOTCH2R | CCAAAGTGATAGGGCTGAA | |
| <i>PLAUR</i> | PLAURF | ATTGCCGTGTGGAAGAGT | 140 |
| | PLAURR | TGAGGAAGGTTTCTCAATCA | |
| <i>GLTSCR2</i> | GLTSCR2F | CCCCAAATGAAAACTCTTCTTC | 95 |
| | GLTSCR2R | CTAACAATGAATAACCGCCATTC | |
| <i>MGMT</i> | MGMT α F | GGTAAATTAAGGTATAGAGTTT | 200 |
| | MGMT α R | AAACCCAAAAAAAAACAAAATAT | |

Optimización de la PCR

Para preparar las mezclas de PCR diluimos las muestras de ADN de cada paciente hasta obtener 20 ng/ μ L en agua MilliQ estéril. Con cada mezcla de PCR preparamos dos tubos, uno con ADN (problema) y otro sin ADN (control negativo). La Tabla 2 muestra la composición de las mezclas individuales de PCR.

Tabla 2. Mezclas individuales de PCR para todos los amplicones

| Componente | μL |
|----------------------------------|--------------------------|
| Agua MilliQ estéril | 19.0 |
| Buffer de PCR 10x | 2.5 |
| dNTPs 10 mM c/u | 0.5 |
| Iniciadores F/R (10 μ M c/u) | 0.75 |
| Taq ADN polimerasa 1 U/ μ L | 0.5 |
| ADN (20 ng/ μ L) | 1.0 |
| Total | 25.0 |

F, iniciador forward.

R, iniciador reverse.

Para asegurar las condiciones óptimas de amplificación llevamos a cabo pruebas con un gradiente de temperatura de 55 °C a 65 °C y un gradiente de concentración de MgCl₂ de 1.5 a 3.0 mM.

Programas de termociclado IDH1, IDH2, Codelección 1p/19q y MGMT

Los programas del termociclador para generar todos los amplicones consistieron en 1) un ciclo desnaturalización a 94 °C 5 min; 2) 30-40 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94 °C por 30 s, annealing por 30 s (56 °C para IDH1, 60 °C para IDH2, 55 °C para 1p/19q y 55 °C para MGMT); 3) extensión final a 72 °C por 10 min; 4) conservación a 25 °C por tiempo indefinido. Para los amplicones IDH1, IDH2 y 1p/19q los ciclos de amplificación fueron 30 y para el amplicón MGMT fueron 40.

PCR IDH1

Añadimos 1 μ L de ADN (20 ng/ μ L) o de agua a las mezclas problema y control negativo, respectivamente. A ambos tubos dimos un pulso en vórtex, los centrifugamos a 7,000 rpm por 10 s, los colocamos en el termociclador y los incubamos con el programa IDH1 por 30 ciclos.

PCR IDH2

Preparamos las mezclas de PCR de *IDH2* igual que las de *IDH1*, excepto por los iniciadores.

Electroforesis en geles SB-agarosa al 2%

Una vez finalizados los programas de PCR en el termociclador, aplicamos muestras de las mezclas de PCR en un gel de agarosa al 2% con amortiguador de borato de sodio (SB) (Brody et al. 2004). Corrimos el gel a 90 V durante 90 min y lo teñimos con EtBr (1 µg/mL) durante 45 min.

Después de la tinción revelamos el gel en el fotodocumentador (Bio-Rad, Gel Doc XR) con luz UV y registramos la imagen.

Purificación de los amplicones IDH1 e IDH2

Una vez confirmada la amplificación, purificamos los productos de PCR. Transferimos 19 µL de cada mezcla de PCR amplificada a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL; a cada uno añadimos 1.9 µL de acetato de sodio 3 M y 57 µL de EtOH grado biología molecular, agitamos los tubos 10 s en vórtex y los guardamos a -20 °C.

El día siguiente descongelamos las mezclas a temperatura ambiente, centrifugamos los tubos a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C, aspiramos cuidadosamente el sobrenadante y lo descartamos en un recipiente con Cloralex al 2%; a cada tubo añadimos 700 µL de EtOH al 70% frío y le dimos vórtex por 10 s para que la pastilla se desprendiera; centrifugamos nuevamente a 15,000 rpm por 15 min a 4 °C y descartamos el sobrenadante por aspiración cuidadosa. Colocamos los tubos en un termoblock a 55 °C por el tiempo suficiente para evaporar el residuo de EtOH.

Para disolver los productos de PCR añadimos 50 µL de agua MilliQ estéril y dejamos reposar la mezcla 30 min a temperatura ambiente. Para determinar la pureza y concentración de los productos de PCR utilizamos un espectrofotómetro Epoch (BioTek) en el que medimos la relación A_{260}/A_{280} , tomando en cuenta que el rango aceptable es 1.8-2.0.

Secuenciación y análisis de los amplicones IDH1 e IDH2

Rotulamos los tubos, ajustamos la concentración de ADN a 50 ng/μL y los enviamos al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) para su secuenciación con el método de Sanger (Yu et al. 2017).

Una vez recibidas, comparamos las secuencias obtenidas con las de los alelos silvestres y mutantes en búsqueda de SNPs y analizamos los cromatogramas secuenciación para identificar los alelos y su estado homócigo o heterócigo.

Codelección 1p/19q

Diseño de iniciadores

Para el diseño y elección de los iniciadores utilizamos las secuencias de referencia de GenBank NM_024408.4 para *NOTCH2*; NM_004091.4 para *E2F2*; NM_002659.4 para *PLAUR*; AF182076.1 para *GLTSCR2*. Para la búsqueda y selección de iniciadores que delimiten las áreas de interés utilizamos el programa PrimerBlast (NCBI).

Una vez seleccionados los iniciadores potenciales, los analizamos con Oligo Analyzer para evaluar sus características, especificidad y ausencia de estructuras secundarias. Finalmente seleccionamos una pareja de iniciadores para cada gen (Tabla 2).

PCR de los amplicones E2F2, NOTCH2, PLAUR, y GLTSCR2

Para las reacciones de PCR preparamos diluciones del ADN de cada paciente con 20 ng/μL en agua MilliQ estéril. Utilizamos guantes de nitrilo nuevos y descongelamos los reactivos de PCR por inmersión de los tubos en hielo picado. De cada mezcla de PCR preparamos dos tubos con buffer de PCR 1x, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM (c/u), iniciadores 0.3 mM (c/u). Añadimos 1 μL de ADN (20 ng/μL) a la mezcla problema y 1 μL de agua a la mezcla de control negativo; dimos un pulso en vórtex por 5 s a ambos tubos y los centrifugamos a 7,000 rpm por 10 s. Luego los colocamos en el termociclador con el programa “Codelección 1p/19q” por 30 ciclos.

Para el amplicón E2F2 utilizamos la pareja de iniciadores E2F2F/R, para el amplicón NOTCH2 la pareja NOTCH2F/R, para el amplicón PLAUR la pareja PLAURF/R y para el amplicón GLTSCR2 la pareja GLTSR2F/R.

Electroforesis en geles SB-agarosa al 2%

Una vez finalizados los programas de PCR en el termociclador, aplicamos muestras de las mezclas de PCR en un gel de agarosa al 2% con borato de sodio (Brody et al. 2004), como lo hicimos para las mezclas de IDH1 e IDH2.

Estado de metilación del promotor *MGMT*

Diseño de iniciadores

Para el diseño de los iniciadores utilizamos la secuencia del gen *MGMT* de GenBank (Acceso NM_002412.5). Para la búsqueda de iniciadores que amplificaran las regiones de interés utilizamos el programa Methprimer (NCBI).

Analizamos los posibles iniciadores con Oligo Analyzer para evaluar sus características, especificidad y ausencia de estructuras secundarias. Finalmente seleccionamos una pareja de iniciadores para amplificar una región del gen *MGMT* (Tabla 2).

Concentración y desnaturalización del ADN

Utilizamos 1-10 µg de cada muestra de ADN de glioma contenidos en 18 µL y los colocamos en tubos de PCR de 200 µL. Llevamos cada tubo al termociclador con el programa “PreBisNa” (Tabla 3); después del paso inicial de 3 min a 94 °C pausamos el programa, inmediatamente después añadimos 2 µL de NaOH 3 M a cada tubo y continuamos el programa de termociclado.

Tabla 3. Programa de termociclado PreBisNa

| Etapa | °C | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-----------|---------------|---------------|
| Desnaturalización inicial | 94 | 3 min | 1 |
| Desnaturalización (NaOH) | 37 | 25 min | 1 |
| Conservación | 25 | ∞ | 1 |

Conversión de residuos de citosina a uracilo

Una vez finalizado el programa pasamos los 20 μL de cada tubo a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y le añadimos 380 μL de la solución de conversión fresca (agua MilliQ estéril 690 μL , 0.52 g de bisulfito de sodio, 175 μL de NaOH 2 M, 125 μL de hidroquinona 1 M, 10 μL de CTAB 200 mM); dimos un pulso de 5 s en el vórtex y distribuimos los 400 μL de cada tubo a cuatro tubos de PCR de 200 μL (100 μL /tubo).

Una vez distribuidos los volúmenes de cada muestra, colocamos los tubos en el termociclador con el programa BisNa (Tabla 4); al finalizar el programa reunimos el contenido de cada grupo de muestras en un tubo de 2 mL.

Tabla 4. Programa de termociclado BisNa

| Etapa | $^{\circ}\text{C}$ | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|--------------------|----------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95 | 30 s | 1 |
| Reacción | 58 | 20 min | 3 |
| Desnaturalización | 95 | 10 s | |
| Reacción | 58 | 20 min | 1 |
| Conservación | 21 | ∞ | 1 |

Purificación del ADN modificado con nanopartículas superparamagnéticas recubiertas de sílica

A cada tubo con 100 μL de la mezcla de ADN modificado añadimos 250 μL de TES y 25 μL de SDS al 10% y le dimos un pulso en el vórtex; luego añadimos a cada tubo 500 μL de cloroformo y los mezclamos con vórtex hasta observar un contenido homogéneo; colocamos los tubos en la microcentrífuga y los centrifugamos a 13,000 rpm por 15 min; recuperamos cuidadosamente el sobrenadante por aspiración (~200 μL) evitando acarrear residuos de la interfase y lo pasamos a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL.

Con las partículas magnéticas del kit Magnesil (Promega[®]) obtuvimos rendimientos muy bajos o nulos del ADN modificado (datos no mostrados). En cambio, con las nanopartículas superparamagnéticas recubiertas de sílica

sintetizadas por el Dr. José Luis Sánchez en la División de Materiales Avanzados del IPICYT (en adelante llamadas NP-DMA), la Dra. Lucia Orellana comprobó en nuestro laboratorio que las NP-DMA recuperan 8.3 veces más ADN puro que las partículas de Magnesil. Este procedimiento facilita la purificación del ADN modificado, pues no requiere centrifugación sino solo la aplicación del imán para atrapar las NP-DMA con el ADN puro unido a ellas.

Preparamos tubos de microcentrífuga de 2 mL con 200 μ L del sobrenadante de la mezcla con ADN modificado y a cada uno añadimos 800 μ L de NaCl 5 M. Dimos vórtex por 10 s a la mezcla con NP-DMA (142.8 mg/mL) para suspender las nanopartículas e inmediatamente añadimos 15 μ L de la suspensión a cada tubo. Dejamos reposar los tubos 5 min a temperatura ambiente y nuevamente los mezclamos por vórtex.

Colocamos los tubos en un soporte magnético (Figura 5). La atracción magnética de las NP-DMA es instantánea. Aspiramos cuidadosamente y descartamos el contenido de cada tubo sin tocar las NP-DMA adheridas magnéticamente a la pared. Mientras las NP-DMA seguían adheridas magnéticamente a la pared a cada tubo añadimos 100 μ L de EtOH al 70%, colocamos los tubos fuera del soporte magnético y les dimos vórtex. Colocamos nuevamente los tubos en el soporte magnético, descartamos el EtOH al 70% por aspiración cuidadosa lavamos otras dos veces con 100 μ L de EtOH al 70%.

Con las tapas de los tubos abiertas en el soporte magnético, dejamos secar al aire las NP-DMA por 5 min. Luego añadimos 100 μ L de agua MilliQ a cada tubo, les dimos vórtex por 5 s y los colocamos en un termoblock a 65 °C por 15 min.

Finalmente llevamos los tubos al soporte magnético, donde la separación de las NP-DMA fue instantánea. Aspiramos cuidadosamente el líquido donde se encontraba disuelto el ADN modificado, procurando no tocar ni acarrear las NP-DMA.

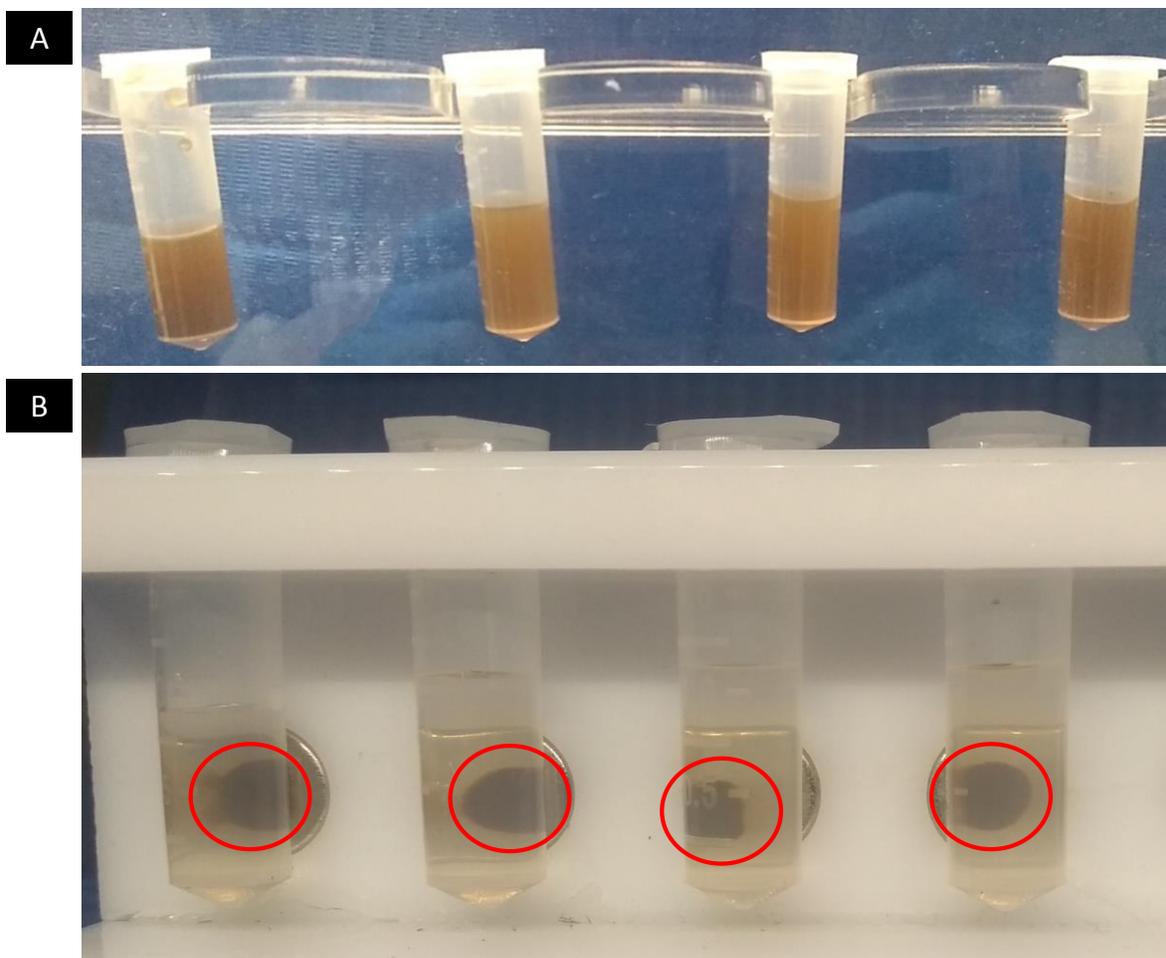


Figura 5. Uso de nanopartículas superparamagnéticas (NP-DMA) para purificar el ADN del amplicón MGMT modificado

(A) Aspecto de las mezclas con NP-DMA y ADN modificado en presencia de NaCl 1M. (B) Aspecto de las mezclas con las manchas oscuras de las NP-DMA concentradas y adheridas a cada imán de la gradilla (incluidas dentro un círculo rojo), lo cual permite separarlas inmediatamente y lavarlas repetidamente sin tener que centrifugarlas.

Desulfonación de los residuos de uracilo

A cada tubo con 100 μ L añadimos 3 μ L de NaOH 10 M; los mezclamos con vórtex y los colocamos en el termoblock a 37 °C por 20 min para desulfonar los residuos de uracilo. Luego neutralizamos el pH con 3 μ L de HCl 10 M y mantuvimos los tubos otros 10 min en el termoblock a 37 °C.

Purificación del ADN modificado

Añadimos 800 μL de solución de NaCl 5 M a cada tubo, suspendimos las NP-DMA mediante vórtex por 10 s y añadimos 15 μL de NP-DMA (114 mg/mL) a cada tubo y les dimos vórtex. Dejamos reposar los tubos 5 min a temperatura ambiente y nuevamente mezclamos por vórtex.

Colocamos los tubos en una gradilla magnética (i.e., con imanes individuales fijos para cada tubo) en la que la separación de las NP-DMA es instantánea. Aspiramos y descartamos cuidadosamente el contenido de cada tubo sin tocar las NP-DMA adheridas magnéticamente a la pared. A cada tubo con NP-DMA añadimos 100 μL de EtOH al 70%, colocamos los tubos fuera de la gradilla magnética y les dimos vórtex.

Nuevamente colocamos los tubos en la gradilla magnética, descartamos el EtOH por aspiración cuidadosa, los colocamos nuevamente en la gradilla magnética y descartamos todo el volumen por aspiración.

Con los tubos en el soporte magnético con las tapas abiertas, dejamos secar al aire las NP-DMA por 5 min. Luego añadimos 50 μL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) a cada tubo, dimos vórtex por 5 s y los mantuvimos en un termoblock a 65 °C por 15 min.

Finalmente colocamos los tubos en la gradilla magnética, donde la adhesión de las NP-DMA a la pared de los tubos en la zona del imán fue instantánea y entonces aspiramos cuidadosamente el líquido donde se encontraba disuelto el ADN modificado, procurando no tocar ni acarrear las NP-DMA.

Calidad y concentración del ADN modificado

Para determinar la pureza y concentración del ADN medimos la relación A_{260}/A_{280} tomando en cuenta que el rango aceptable es 1.8-2.0. Rotulamos los tubos con ADN puro, los sellamos con Parafilm y los conservamos a -20 °C.

PCR del amplicón MGMT

Para cada mezcla de PCR preparamos dos tubos con los iniciadores MGMT α F/R con las secuencias señaladas en la Tabla 2. Añadimos 2 μL de ADN (20 ng/ μL) a cada tubo, a ambos les dimos un pulso en vórtex por 5 s y los centrifugamos a 7,000

rpm por 10 s. Luego los colocamos en el termociclador, en el que corrimos el programa MGMT α por 40 ciclos.

Electroforesis en geles SB-agarosa al 2%

Una vez finalizados los programas del termociclador, aplicamos muestras de las mezclas de PCR en un gel de agarosa al 2% como lo hicimos para las mezclas de los amplicones IDH1 e IDH2 y de la codelección 1p/19q.

Purificación de los productos de PCR

Una vez confirmada la amplificación, purificamos los productos de PCR. Transferimos 19 μ L de cada mezcla de PCR amplificada a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL a los que añadimos 1.9 μ L de acetato de sodio 3 M y 57 μ L de EtOH grado biología molecular. Aplicamos un pulso de vórtex de 10 s y guardamos los tubos a -20 °C.

Al día siguiente descongelamos las mezclas por inmersión de los tubos en hielo y los centrifugamos a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C; luego aspiramos cuidadosamente el sobrenadante y lo descartamos en un recipiente con Cloralex al 2%. A cada pastilla añadimos 700 μ L de EtOH al 70% frío y dimos vórtex por 10 s para desprender la pastilla, centrifugamos nuevamente a 15,000 rpm por 15 min a 4 °C y descartamos el sobrenadante por aspiración cuidadosa. Colocamos los tubos con pastillas de ADN de los productos de PCR lavados en un termoblock a 55 °C por 5 min para eliminar los restos de EtOH.

Para disolver los productos de PCR añadimos 50 μ L de agua MilliQ estéril y esperamos 30 min a temperatura ambiente. Determinamos la pureza y concentración de los productos de PCR con el espectrofotómetro Epoch (BioTek).

Secuenciación y análisis

Ajustamos la concentración de los productos de PCR a 50 ng/ μ L y los enviamos al LANBAMA para su secuenciación. Una vez recibidas las secuencias, las alineamos y analizamos los cambios en las islas CpGs del promotor del gen *MGMT*, para determinar el grado de metilación.

Resultados

Obtención del ADN de la sangre y las biopsias de los pacientes con gliomas

Extracto crudo de los fragmentos de biopsia

Después de homogenizar cada fragmento de biopsia añadimos el buffer de lisis y mantuvimos la mezcla a 55 °C toda la noche para obtener el extracto crudo como un líquido homogéneo ligeramente opaco, sin partículas visibles.

Extracción con cloroformo

Después de añadir cloroformo al extracto crudo y centrifugar las mezclas, se separaron tres fases: orgánica, interfase y acuosa (Figura 6).

La fase orgánica, localizada en la parte inferior del tubo, de apariencia transparente y color amarillo o ligeramente blanquecino, incluye los contaminantes disueltos en cloroformo.

La interfase, localizada en la parte media del tubo, incluye restos del tejido de color marrón.

La fase acuosa, translúcida, contiene el material genético y otros componentes solubles. La recuperamos cuidadosamente por aspiración sin contaminantes de la interfase y la trasvasamos a un tubo nuevo.

Eliminación de contaminantes de la fase acuosa

La adición de NaCl enturbió la fase acuosa (Figura 7). Una vez centrifugada esta mezcla, los contaminantes precipitados se empacaron en el fondo del tubo (Figura 8) y los sobrenadantes fueron trasvasados a tubos nuevos.

ADN precipitado

La adición de isopropanol a la fase acuosa provocó la formación de pequeñas madejas blanquecinas de ADN precipitado (Figura 9).

ADN lavado

Las madejas de ADN fueron sedimentadas y lavadas tres veces por centrifugación con EtOH 70%.

Pureza y rendimiento del ADN

El intervalo de valores de la relación A_{260}/A_{280} del ADN de los fragmentos de biopsias fue 1.8-1.9 (Tabla 5). El intervalo del rendimiento fue de 104.1-237.9 μg para los fragmentos de biopsias y de 5.3-9.3 μg para las muestras de sangre. El ADN obtenido de ambas fuentes fue por tanto de calidad y en cantidad suficiente para analizar los biomarcadores.

Tabla 5. Rendimiento del ADN de las muestras de gliomas (100 μL) y sangre (50 μL) de los pacientes

| Paciente | Fuente | A_{260}/A_{280} (promedio) | ADN | |
|-----------------|---------------|--|------------------------------------|---|
| | | | ng/μL | Rendimiento (μg) |
| VLV | Glioma | 1.9 | 1220.2 | 122.0 |
| | Sangre | 1.8 | 250.2 | 7.5 |
| MAN | Glioma | 1.9 | 1041.4 | 104.1 |
| | Sangre | 1.8 | 291.7 | 8.8 |
| RSG | Glioma | 1.9 | 1253.6 | 125.4 |
| | Sangre | 1.8 | 175.1 | 5.3 |
| RHC | Glioma | 1.9 | 2378.6 | 237.9 |
| | Sangre | 1.9 | 311.3 | 9.3 |

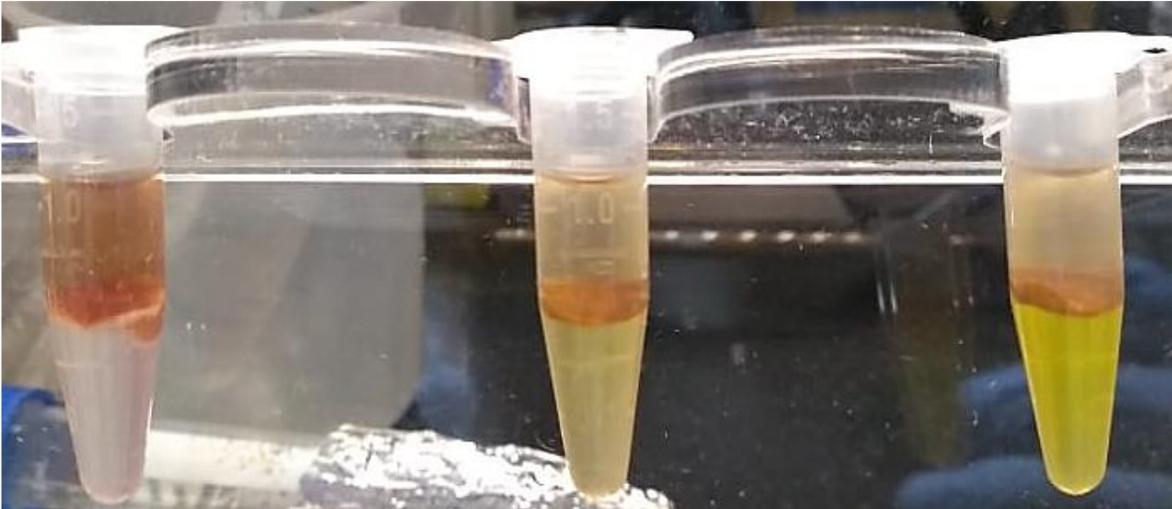


Figura 6. Fase orgánica, interfase y fase acuosa de los extractos crudos de fragmentos de glioma mezclados con cloroformo

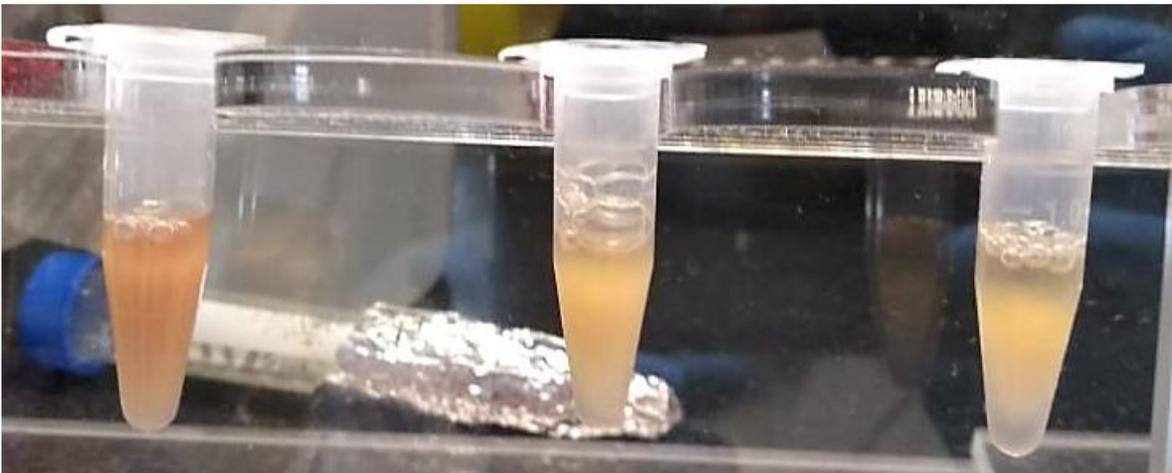


Figura 7. Contaminantes precipitados de la fase acuosa de fragmentos de glioma
Turbiedad observada en las muestras inmediatamente después de añadir NaCl 5 M.

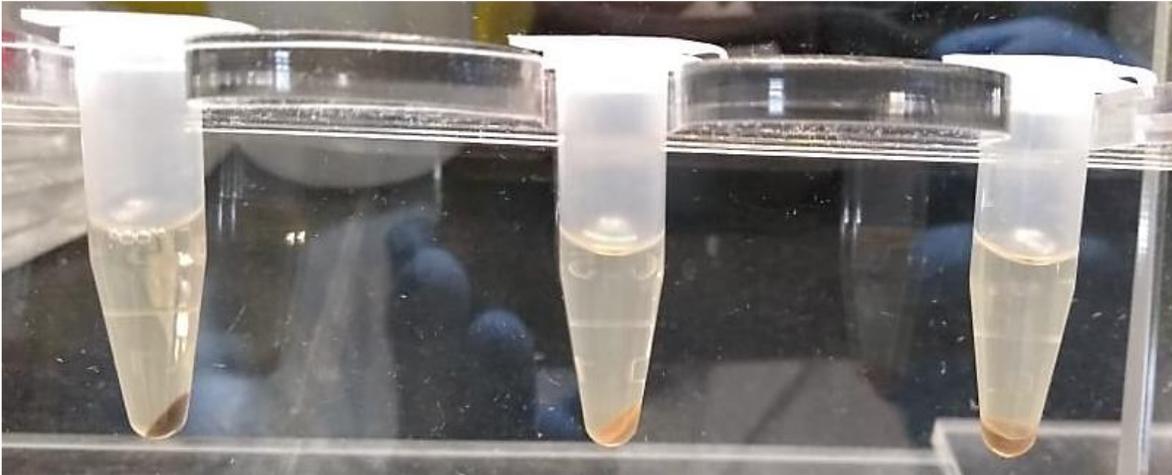


Figura 8. Contaminantes de la fase acuosa sedimentados por centrifugación
Una vez centrifugados, los contaminantes se empacaron en el fondo y los sobrenadantes fueron aspirados cuidadosamente para precipitar el ADN disuelto en la fase acuosa.

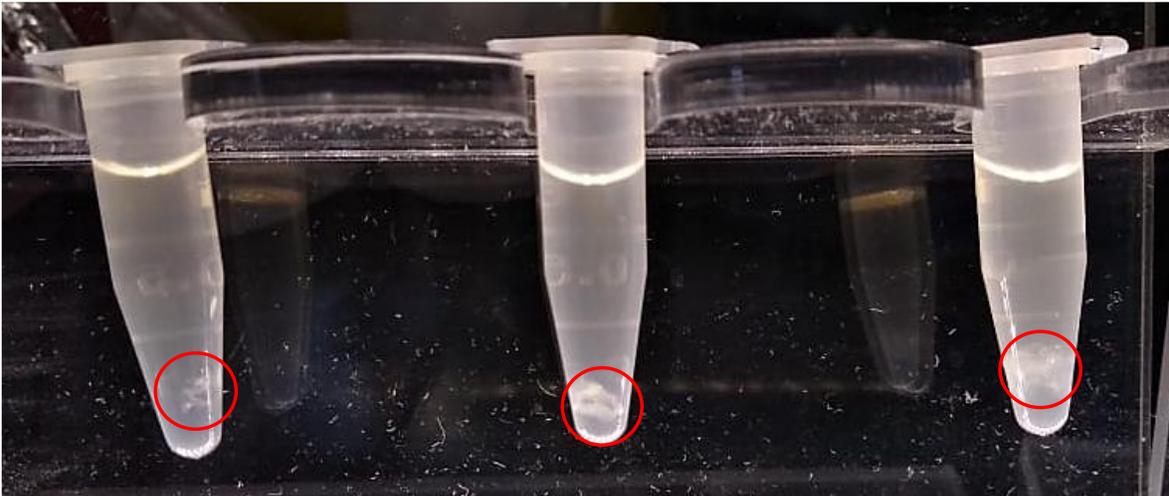


Figura 9. ADN de la fase acuosa precipitado con isopropanol
Las madejas de ADN precipitado se encuentran dentro de los círculos rojos superpuestos a la imagen de cada tubo.

Identificación de los polimorfismos de *IDH1* e *IDH2*

Las secuencias de los iniciadores empleados para generar los amplicones IDH1 e IDH2 se enlistan en la Tabla 2.

Las condiciones usadas para generar la banda única de 194 pb del amplicón IDH1 fueron MgCl₂ 1.5 mM y annealing a 56 °C; en tanto que las condiciones para generar la banda única de 187 pb del amplicón IDH2 fueron MgCl₂ 1.5 mM y annealing a 60 °C.

A partir del ADN de los gliomas y la sangre de los cuatro pacientes fue amplificada una banda única y nítida correspondiente al amplicón IDH1 de 194 pb (Figuras 10 y 11) y otra correspondiente al amplicón IDH2 de 187 pb (Figuras 10 y 12).

La Tabla 6 muestra la relación A_{260}/A_{280} y la concentración de los productos de PCR purificados.

Analizamos un total de 16 secuencias nucleotídicas de los amplicones IDH. Ocho del amplicón IDH1 (cuatro forward, cuatro reverse) y ocho del amplicón IDH2 (cuatro forward, cuatro reverse). El alineamiento confirmó la identidad del amplicón de 194 pb del gen *IDH1* (Figura 13A) y la del amplicón de 187 pb del gen *IDH2* (Figura 13B).

El análisis de las secuencias y de los cromatogramas respectivos demostró que basta emplear un iniciador (forward o reverse) para la secuenciación y el análisis de cada amplicón.

Tabla 6. Rendimiento de los amplicones IDH1 e IDH2 generados a partir del ADN de los gliomas y la sangre de los pacientes

| Amplicón | Paciente | Fuente | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | Concentración (ng/μL) | Rendimiento (μg) |
|----------|----------|--------|------------------------------------|-----------------------|------------------|
| IDH1 | VLV | Glioma | 1.8 | 56.4 | 2.8 |
| | | Sangre | 1.8 | 73.2 | 3.7 |
| | MAN | Glioma | 1.8 | 79.0 | 4.0 |
| | | Sangre | 1.8 | 71.7 | 3.6 |
| | RSG | Glioma | 1.8 | 90.6 | 4.5 |
| | | Sangre | 1.8 | 62.0 | 3.1 |
| | RHC | Glioma | 1.8 | 50.5 | 2.5 |
| | | Sangre | 1.8 | 70.1 | 3.5 |
| IDH2 | VLV | Glioma | 1.8 | 50.5 | 2.5 |
| | | Sangre | 1.8 | 51.5 | 2.6 |
| | MAN | Glioma | 1.9 | 77.6 | 3.9 |
| | | Sangre | 1.8 | 50.6 | 2.5 |
| | RSG | Glioma | 1.8 | 52.5 | 2.6 |
| | | Sangre | 1.8 | 54.1 | 2.7 |
| | RHC | Glioma | 1.8 | 60.2 | 3.0 |
| | | Sangre | 1.8 | 55.4 | 2.8 |

En dos pacientes encontramos mutaciones puntuales en los amplicones IDH1. La primera correspondió al SNP rs121913499 (R132H). En la segunda, no registrada en GenBank, cambió la tercera base del codón 146 por C en lugar de T (GGT → GGC). Esta mutación es sinónima, pues ambos tripletes, el del alelo silvestre y el del mutante, codifican cisteína. Las secuencias de los amplicones IDH1 de los otros dos pacientes correspondieron a la secuencia del alelo *IDH1* silvestre y las de los amplicones IDH2 de los cuatro pacientes correspondieron a la secuencia del alelo silvestre (Tabla 7).

Tabla 7. Polimorfismos de los genes *IDH1* e *IDH2* identificados en los gliomas

| Paciente | Gen | SNP | Tipo |
|----------|------|-----------------|--------------------|
| VLV | IDH1 | No | Silvestre |
| | IDH2 | No | Silvestre |
| MAN | IDH1 | No | Silvestre |
| | IDH2 | No | Silvestre |
| RSG | IDH1 | rs121913499 | Homocigoto mutante |
| | IDH2 | No | Silvestre |
| RHC | IDH1 | NR ^a | Homocigoto |
| | IDH2 | No | Silvestre |

^a NR, No registrado en GenBank. Se trata de una mutación del gen *IDH2*, que porta el codón GGT en lugar del GGC (silvestre) en el triplete 146; la mutación es sinónima, pues ambos tripletes codifican cisteína.

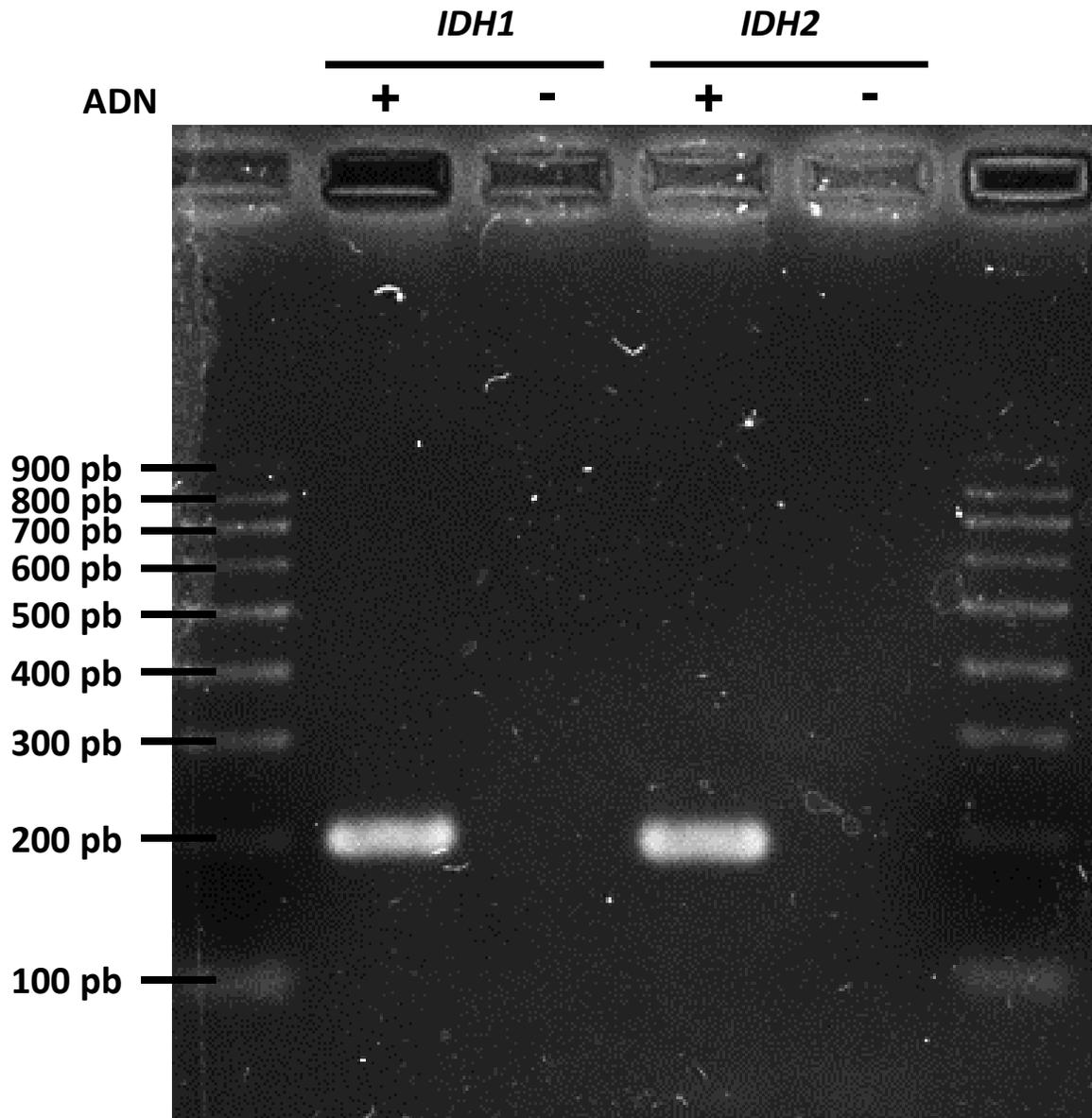


Figura 10. Gel de agarosa al 2% con los amplicones IDH1 (194 pb) e IDH2 (187 pb) generados a partir del glioma del paciente VLV

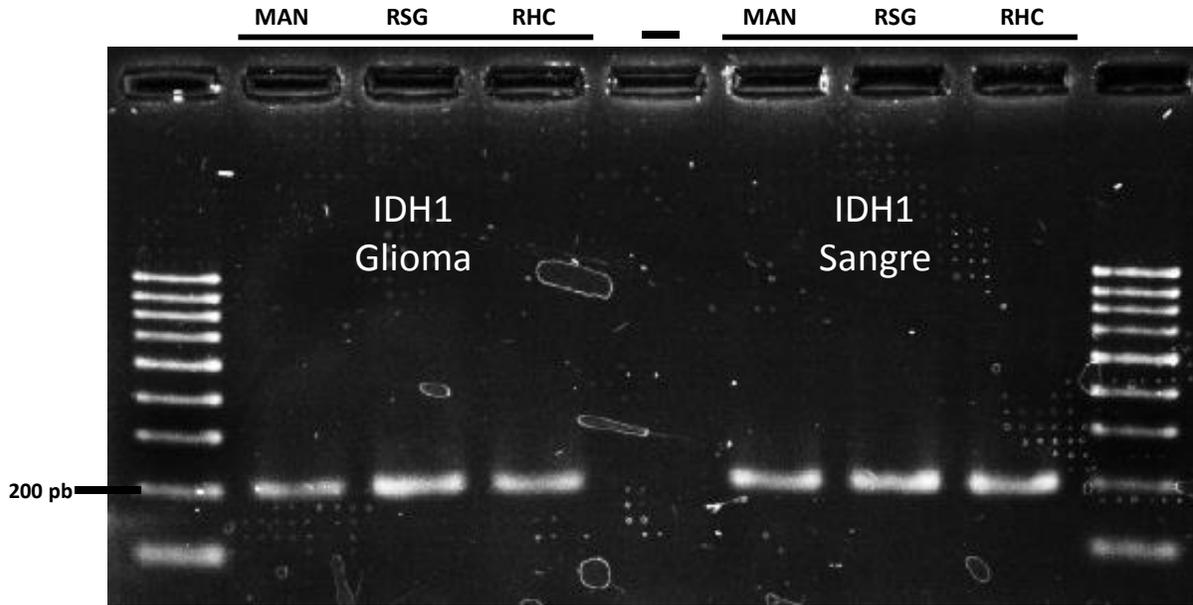


Figura 11. Gel de agarosa al 2% con los amplicones IDH1 (194 pb), generados a partir del ADN de los gliomas y la sangre de los pacientes MAN, RSG y RHC, respectivamente

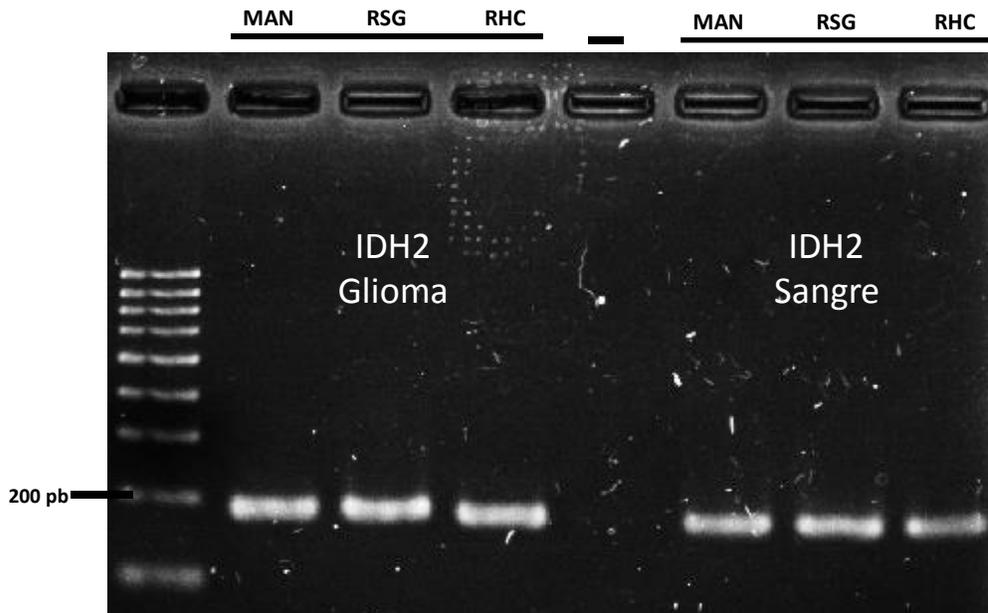


Figura 12. Gel de agarosa al 2% con los amplicones IDH2 (187 pb), generados a partir del ADN de los gliomas y la sangre de los pacientes MAN, RSG y RHC, respectivamente

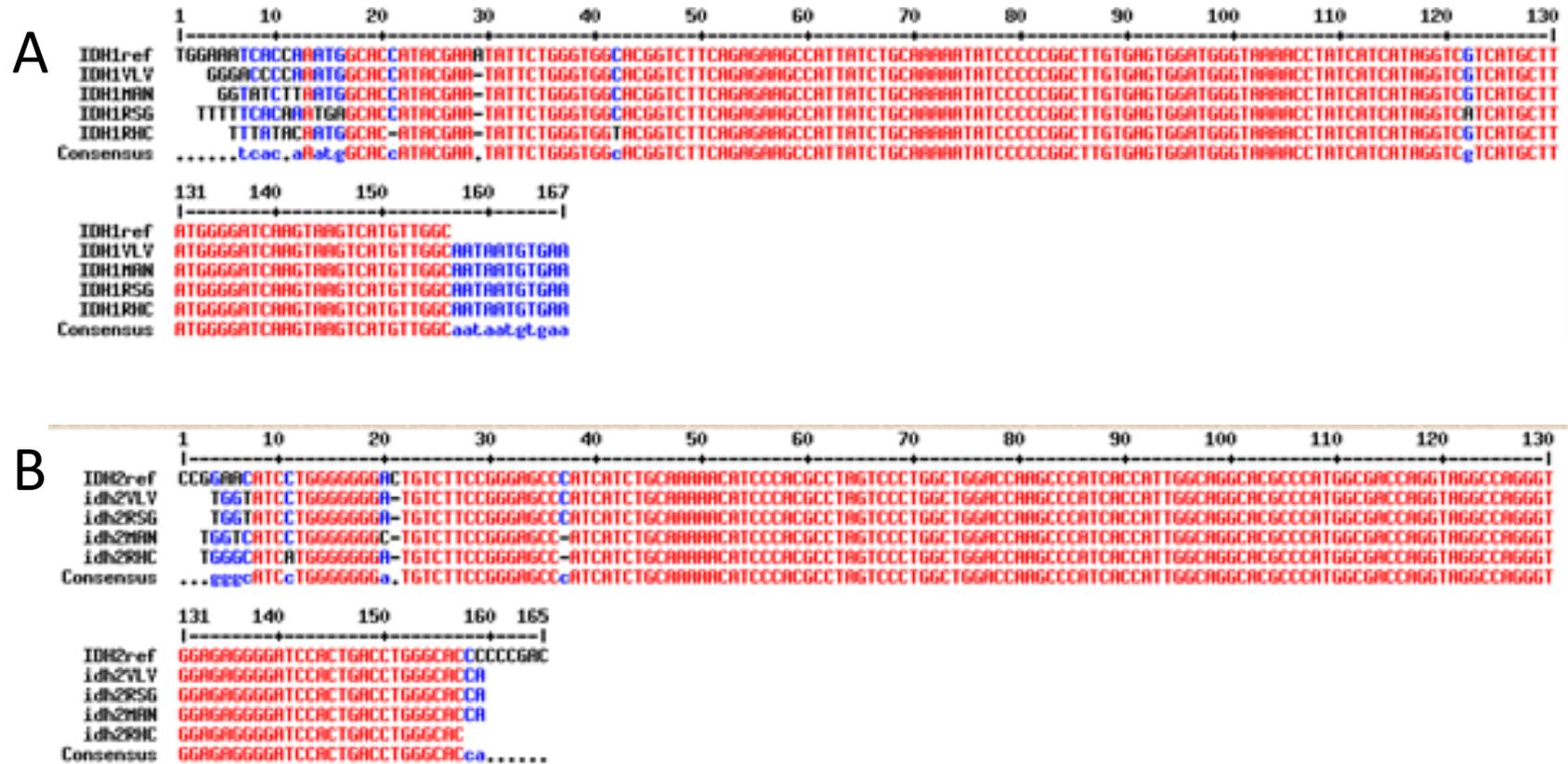


Figura 13. Alineamiento de las secuencias de los amplicones IDH1 e IDH2 de los cuatro pacientes (A) Secuencias de los amplicones IDH1. (B) Secuencias de los amplicones IDH2. Las letras rojas indican las bases de la secuencia silvestre y las azules los polimorfismos.

Codelección 1p/19q

Las secuencias de los iniciadores empleados para generar los amplicones E2F2, NOTCH2, PLAUR y GLTSCR2 se enlistan en la Tabla 2.

A partir de ADN del glioma y la sangre de los cuatro pacientes obtuvimos bandas únicas y nítidas con los tamaños esperados para los cuatro amplicones: 124 pb del amplicón E2F2, 72 pb del amplicón NOTCH2, 140 pb del amplicón PLAUR y 95 pb del amplicón GLTSCR2 (Figuras 14 y 15).

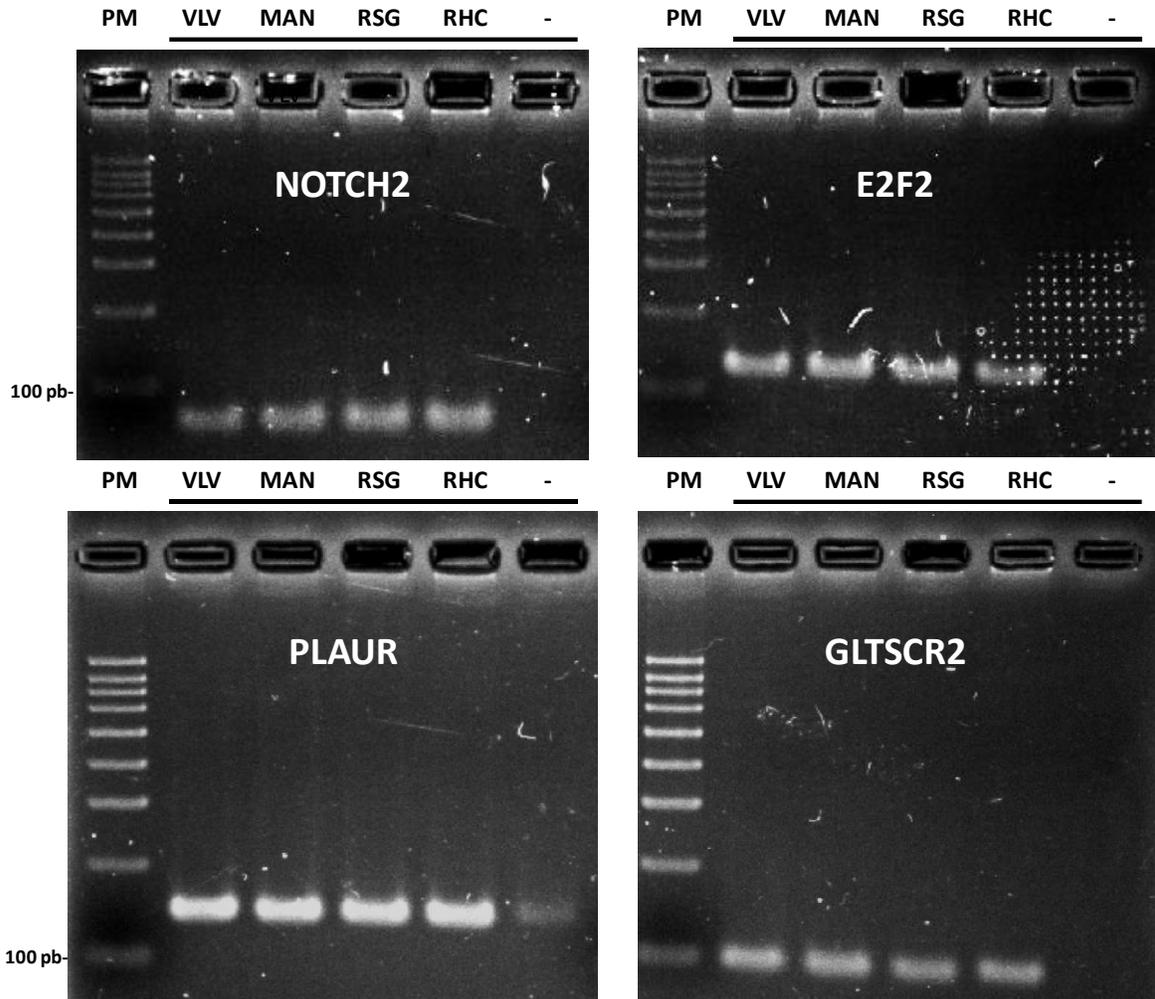


Figura 14. Geles de agarosa al 2% de los amplicones implicados en la codelección 1p/19q generados a partir de la sangre de los pacientes. Los amplicones NOTCH2 (72 pb) y E2F2 (124 pb) corresponden al brazo 1p y los amplicones PLAUR (140) y GLTSCR2 (95 pb) al brazo 19q. En cada imagen se encuentra, de izquierda a derecha, la escalera de 100 pb seguida de las mezclas de PCR para el ADN de sangre de los pacientes VLV, MAN, RSG, RHC y el control negativo (sin ADN).

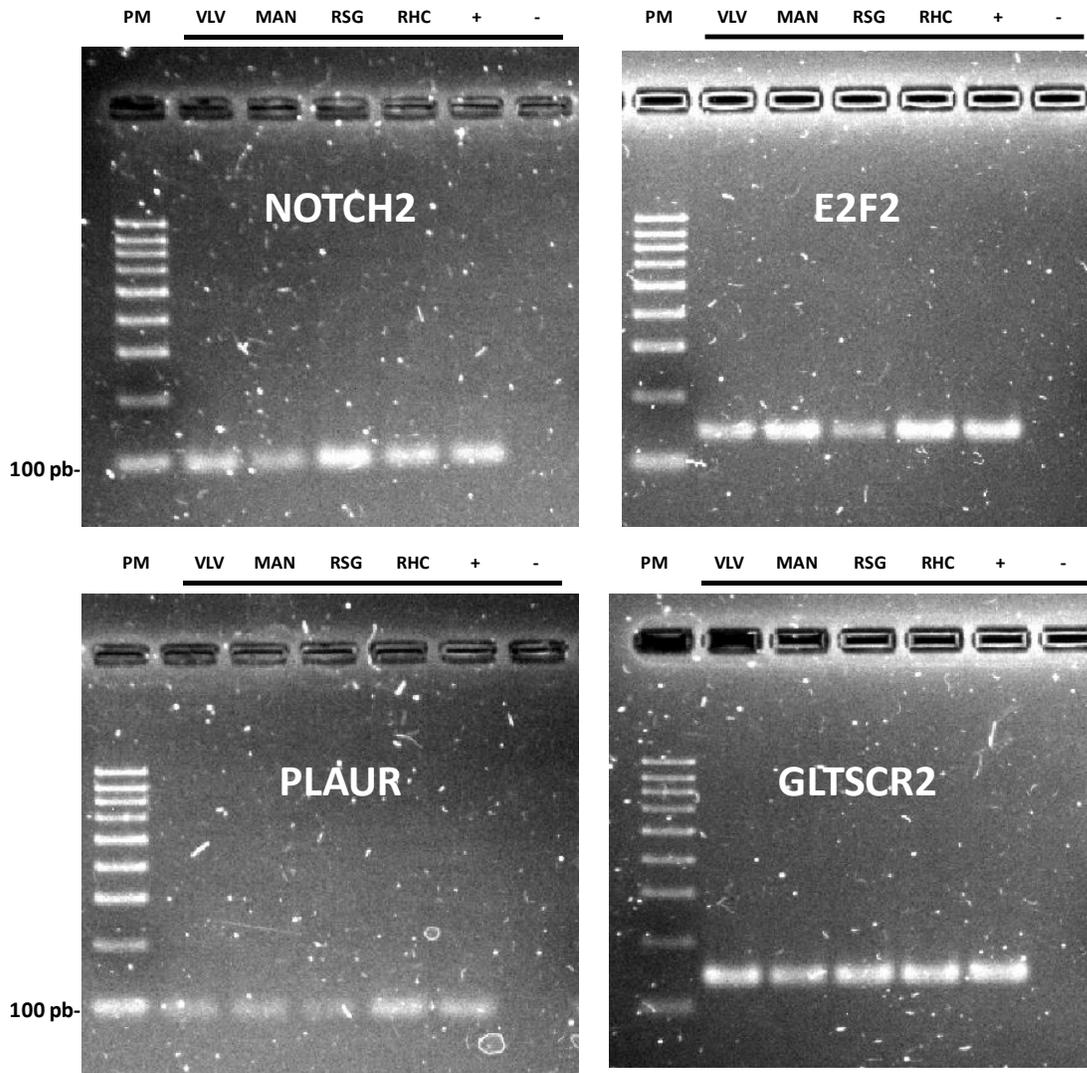


Figura 15. Geles de agarosa al 2% de los amplicones implicados en la codelección 1p/19q, generados a partir del ADN de los cuatro gliomas. Los amplicones NOTCH2 (72 pb) y E2F2 (124 pb) corresponden al brazo 1p y los amplicones PLAUR (140) y GLTSCR2 (95 pb) al brazo 19q. En cada imagen se encuentra, de izquierda a derecha, la escala de 100 pb seguida de las mezclas de PCR para el ADN de los gliomas de los pacientes VLV, MAN, RSG, RHC y el control negativo.

Metilación del promotor *MGMT*

Amplificación de la región de interés

En las mezclas de PCR con ADN de los cuatro gliomas observamos una banda nítida, intensa y única de alrededor de 200 pb, esperada para el amplicón del promotor *MGMT* (Figura 16).

Rendimiento de los amplicones *MGMT*

El rango de concentraciones del ADN de los amplicones *MGMT* fue 37.5-247.1 ng/ μ L y la relación $A_{260}/A_{280} = 1.8$ en todas las muestras (Tabla 8).

Tabla 8. A_{260}/A_{280} , concentración y rendimiento de los amplicones *MGMT* generados a partir de ADN de los gliomas (30 μ L)

| ID | A_{260}/A_{280} | Concentración (ng/μL) | Rendimiento (μg) |
|-----------|-------------------------------------|---|--|
| VLV | 1.8 | 247.1 | 7.4 |
| MAN | 1.8 | 93.8 | 2.8 |
| RSG | 1.8 | 67.8 | 2.0 |
| RHC | 1.8 | 37.5 | 1.1 |

Rendimiento del ADN modificado del amplicón *MGMT*

A partir de mezclas con 10 μ g de los amplicones *MGMT* de los gliomas, el rango de rendimiento del amplicón *MGMT* modificado fue 1.5-2.2 μ g (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimiento del ADN de los amplicones MGMT modificados

| Muestra | Volumen (μL) | A_{260}/A_{280} | Concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$) | ADN (μg) |
|------------|------------------------------|-------------------|--|--------------------------|
| Inicial | | | | |
| VLV | 18 | 1.8 | 555.5 | 10 |
| MAN | 18 | 1.8 | 555.5 | 10 |
| RSG | 18 | 1.8 | 555.5 | 10 |
| RHC | 18 | 1.8 | 555.5 | 10 |
| Modificado | | | | |
| VLV | 30 | 2.0 | 55.2 | 1.7 |
| MAN | 30 | 2.0 | 71.9 | 2.2 |
| RSG | 30 | 2.0 | 53.8 | 1.6 |
| RHC | 30 | 2.0 | 48.9 | 1.5 |

Secuenciación y análisis

La Tabla 10 muestra los porcentajes de metilación del promotor *MGMT* determinados en los cuatro gliomas. Se considera que hay hipermetilación si el 30% o más ($\geq 9/28$) de las islas CpG están metiladas.

Tabla 10. Metilación de las 28 islas CpG de los amplicones MGMT de los gliomas

| Paciente | Islas CpGs metiladas | | Islas CpGs no metiladas | | Estado de metilación |
|----------|----------------------|----|-------------------------|----|----------------------|
| | n | % | n | % | |
| VLV | 13 | 46 | 15 | 54 | Hipermetilado |
| MAN | 17 | 61 | 11 | 39 | Hipermetilado |
| RSG | 13 | 46 | 15 | 54 | Hipermetilado |
| RHC | 3 | 11 | 25 | 89 | Hipometilado |

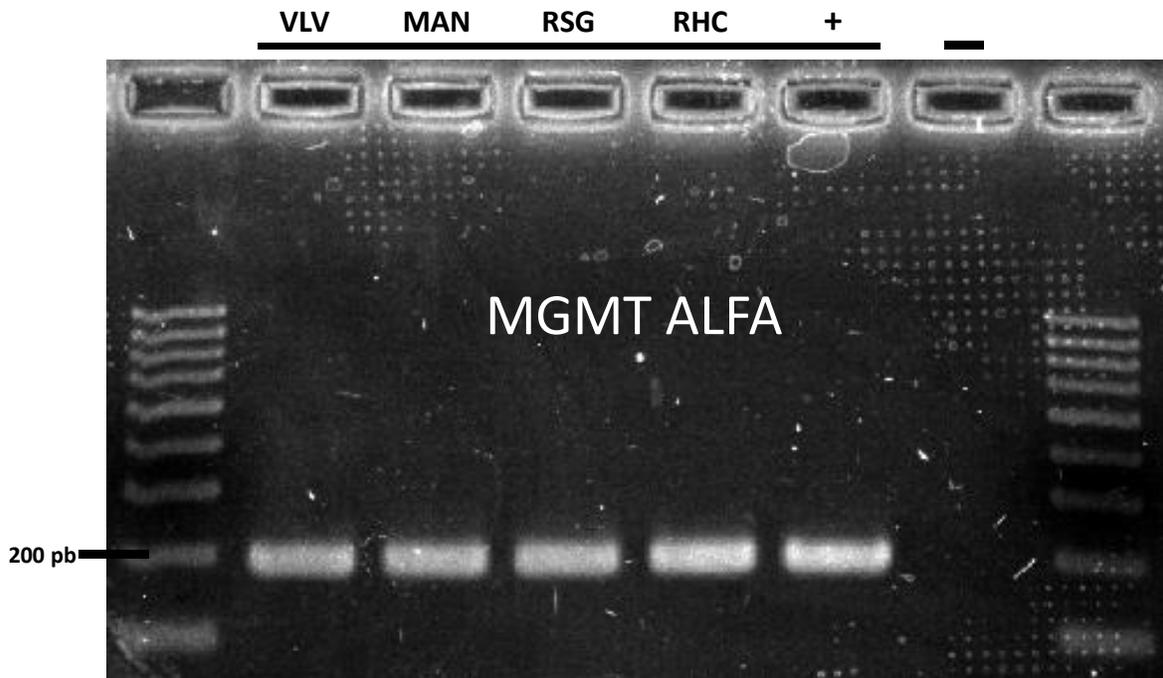


Figura 16. Gel de agarosa al 2% de los amplicones MGMT generados a partir de los gliomas

El carril de la izquierda muestra las bandas de la escalera de 100 pb, seguido por los carriles con ADN de los pacientes VLV, MAN, RSG, RHC, control positivo y control negativo.

Discusión

Los métodos desarrollados en este trabajo y aplicados a las biopsias de cuatro pacientes con gliomas son válidos, reproducibles y confiables y servirán para complementar el diagnóstico histopatológico y mejorar el pronóstico y tratamiento de los pacientes con gliomas.

La fijación de las biopsias con el medio empleado permite preservar, transportar y procesar las muestras para extraer el ADN. Los métodos de extracción de la sangre y de los fragmentos de biopsias de gliomas fijados permitieron obtener ADN adecuado y suficiente para el análisis de los biomarcadores de interés, a saber: 1) los SNPs característicos de los genes *IDH1* e *IDH2*; 2) la amplificación de las regiones de los genes de los brazos 1p y 19q involucrados en la codeleción 1p/19q; y 3) el estado de metilación del promotor del gen *MGMT*.

La secuenciación permitió identificar la presencia/ausencia del SNP rs121913499 del gen *IDH1*. La ausencia de ambas mutaciones está asociada a GBM, en tanto que su presencia se considera de buen pronóstico (Huang et al. 2019).

El análisis de la secuencia del amplicón *IDH2* del paciente RHC permitió identificar un nuevo SNP que consiste en una mutación sinónima del gen *IDH2* que porta el codón GGT en lugar de GGC (silvestre) en el triplete 146, los cuales codifican para cisteína.

La identificación de los SNPs de interés de los genes *IDH1/2* mediante la técnica de ARMS-PCR podría acortar el tiempo de entrega de los resultados ya que bastaría con correr el programa de termo ciclado y confirmación por electroforesis en gel de agarosa y evitamos la espera de resultados de secuenciación (Etlik et al. 2011).

La codeleción 1p/19q no se encontró en ninguno de los cuatro pacientes. La amplificación de los genes implicados mediante PCR en tiempo real para la detección inmediata de la codeleción acortaría sustancialmente el tiempo de entrega de los resultados y podría darles un enfoque cuantitativo (de Dios 2013).

El análisis de los resultados de la PCR de punto final para la codeleción 1p/19q es inmediato, pero el de las mutaciones IDH1/2 y la metilación del promotor del gen *MGMT* depende de la entrega de los resultados de secuenciación de los amplicones correspondientes.

La determinación del estado de metilación del promotor del gen *MGMT* es una herramienta complementaria para el tratamiento, que pudimos llevar a cabo gracias a las bases del método montadas por el M. en C. Isaías Eduardo Hernández Verdin y a la eficiencia de las NP-DMA para purificar el ADN modificado. En tres de los cuatro pacientes con gliomas que tienen el promotor hipermetilado se espera una respuesta favorable al tratamiento con tezolomida. Llama la atención que la proporción de gliomas con hipermetilación en la pequeña muestra incluida en este trabajo sea tan alta (75%), pues usualmente ocurre en apenas un poco más del 30% de los gliomas (Berrocal 2015; Siegal 2016).

La utilidad del amplicón del promotor del gen *MGMT* empleado para la detección de islas CpG es limitada porque la región de interés es rica en guanina y dificulta la amplificación completa del área; además, el diseño de los iniciadores es complejo porque la gran cantidad de pares GC dificulta su especificidad (Siegal 2016). El ensayo de otras técnicas y el uso de iniciadores adicionales para aumentar el número de islas CpGs podrían mejorar el análisis de este biomarcador.

Los resultados de este trabajo nos animan a ofrecer el servicio de identificación de los tres biomarcadores para ampliar las bases del pronóstico y tratamiento de pacientes con gliomas.

Referencias

- Álvarez-Guerrero AF, López-Revilla R (2021) Biomarkers of gliomas and their impact on diagnosis, prognosis, and treatment. *Rev Mex Neurocienc* 22:22–29. <https://doi.org/10.24875/rmn.20000029>
- Berrocal A (2015) Biomarcadores moleculares y genómica en tumores del Sistema Nervioso Central. *Grup clínico Biomarcadores en Oncol* 1–14
- Boulay JL, Miserez AR, Zweifel C, et al (2007) Loss of NOTCH2 positively predicts survival in subgroups of human glial brain tumors. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000576>
- Brody JR, Kern SE, Brody JR (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36:1–2. <https://doi.org/10.2144/04362bm02>
- Cai J, Dai DP, Geng PW, et al (2016) Effects of 22 Novel CYP2D6 Variants Found in the Chinese Population on the Bufuralol and Dextromethorphan Metabolisms In Vitro. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12478>
- Chaturbedi A, Yu L, Linskey ME, Zhou YH (2012) Detection of 1p19q deletion by real-time comparative quantitative PCR. *Biomark Insights*. <https://doi.org/10.4137/BMI.S9003>
- Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H (2017) Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics* 14:284–297. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0519-x>
- Cohen AL, Holmen SL, Colman H (2013) IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13:345. <https://doi.org/10.1007/s11910-013-0345-4>
- de Dios TL (2013) Tecnología en salud
- Etlik O, Koksal V, Arican-baris ST, Baris I (2011) Development and validation of a cost-effective in-house method , tetra-primer ARMS PCR assay , in genotyping of seven clinically important point mutations. *Mol Cell Probes* 25:177–181. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.04.005>
- Everhard S, Kaloshi G, Crinière E, et al (2006) MGMT methylation: A marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *Ann Neurol*.

- <https://doi.org/10.1002/ana.21044>
- Farias-Eisner G, Bank AM, Hwang BY, et al (2012) Glioblastoma biomarkers from bench to bedside: advances and challenges. *Br J Neurosurg* 26:189–194. <https://doi.org/10.3109/02688697.2011.629698>
- Fraser ARR, Bacci B, le Chevoir MAA, Long SNN (2018) Isocitrate Dehydrogenase 1 Expression in Canine Gliomas. *J Comp Pathol* 165:33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.09.005>
- Hu Y, CHEN F, Liu F, et al (2016) Overexpression of TIP30 inhibits the growth and invasion of glioma cells. *Mol Med Rep* 13:605–612. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4619>
- Huang J, Yu J, Tu L, et al (2019) Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: From Basic Discovery to Therapeutics Development. *Front Oncol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00506>
- Kim YJ, Cho YE, Kim YW, et al (2008) Suppression of putative tumour suppressor gene GLTSCR2 expression in human glioblastomas. *J Pathol*. <https://doi.org/10.1002/path.2401>
- LaboLife (2017) La microglía en el sistema nervioso central - MiSistemaInmune. In: Web. <https://www.misistemainmune.es/inmunologia/componentes/la-microglia-en-el-sistema-nervioso-central>. Accessed 22 abr 2021
- Li Y, Shan X, Wu Z, et al (2018) IDH1 mutation is associated with a higher preoperative seizure incidence in low-grade glioma: A systematic review and meta-analysis. *Seizure* 55:76–82. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.01.011>
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Springer Verlag
- Ludwig K, Kornblum HI (2017) Molecular markers in glioma. *J. Neurooncol*. 134:505–512
- Mesa-Cornejo VM, Barros-Núñez P, Medina-Lozano C (2006) Metilación del ADN: Marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer. *Gac Med Mex* 142:81–82
- Nakahata AM, Suzuki DE, Rodini CO, et al (2014) RNAi-mediated knockdown of E2F2 inhibits tumorigenicity of human glioblastoma cells. *Oncol Lett*.

- <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2369>
- NCBI MGMT O-6-methylguanine-DNA methyltransferase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4255>. Accessed 14 abr 2021
- NIH Anormalidad genética predice beneficio de tratamiento en pacientes con raro tumor cerebral - Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cerebro/investigacion/predice-beneficio-tratamiento>. Accessed 11 abr 2021
- Nikiforova MN, Hamilton RL (2011) Molecular diagnostics of gliomas. *Arch Pathol Lab Med*. <https://doi.org/10.1043/2010-0649-RAIR.1>
- Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, et al (2019) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol* 21:v1–v100. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150>
- Parker SJ, Metallo CM (2015) Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations. *Pharmacol. Ther.* 152:54–62
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al (2008) An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* (80-) 321:1807–1812. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>
- Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S (2011) DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/3170>
- Pettet-Ruiz G (2016) Extracción de ADN de sangre completa. En: *Manual de Procedimientos de Biología Molecular*. Red Potosina Interinstitucional de Farmacogenética y Monitorización de Fármacos, San Luis Potosí, pp 1–9
- Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, et al (2013) Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas
- Correspondencia
- Reifenberger G, Blümcke I, Wesseling P, et al (2019) Pathology and Classification of Tumors of the Central Nervous System. En: *Oncology of CNS Tumors*. Springer International Publishing, Cham, pp 3–89
- Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA, et al (2004) Metilación del

- ADN: Un fenómeno epigenético de importancia Médica. *Rev Investig Clin* 56:56–71
- Salamanca U de (2020) Isocitrato deshidrogenasas 1 y 2: Dianas terapéuticas en cáncer. In: DPTO. BIOQUÍMICA Y Biol. Mol. <http://proteinasestructurafuncion.usal.es/moleculas/IsocitratoDeshidrogenasas/index.html>. Accessed 12 abr 2021
- Siegel T (2016) Clinical Relevance of Prognostic and Predictive Molecular Markers in Gliomas. *Adv Tech Stand Neurosurg* 91–108. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21359-0_4
- Strimbu K, Tavel JA (2010) What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 5:463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
- Sun X, Zhang J (2014) Identification of putative pathogenic SNPs implied in schizophrenia-associated miRNAs. *BMC Bioinformatics* 15:1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-194>
- Thon N, Tonn J-C, Kreth F-W (2019) The surgical perspective in precision treatment of diffuse gliomas. *Onco Targets Ther* 12:1497–1508. <https://doi.org/10.2147/OTT.S174316>
- Tuggle CK, Waters WR (2015) Tuberculosis-resistant transgenic cattle. *Proc Natl Acad Sci* 201502972. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502972112>
- Van Bodegraven EJ, van Asperen J V., Robe PAJJ, et al (2019) Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma. *Glia* 67:1417–1433. <https://doi.org/10.1002/glia.23594>
- Wesseling P, Capper D (2018) WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 44:139–150. <https://doi.org/10.1111/nan.12432>
- Wesseling P, Kros JM, Jeuken JWM (2011) The pathological diagnosis of diffuse gliomas: Towards a smart synthesis of microscopic and molecular information in a multidisciplinary context. *Diagnostic Histopathol* 17:486–494. <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2011.08.005>
- Wu S, Li J, Cao M, et al (2016) A novel integrated gene coexpression analysis approach reveals a prognostic three-transcription-factor signature for glioma molecular subtypes. *BMC Syst Biol* 10 Suppl 3:71.

<https://doi.org/10.1186/s12918-016-0315-y>

Yu J, Shi Z, Lian Y, et al (2017) Noninvasive IDH1 mutation estimation based on a quantitative radiomics approach for grade II glioma. *Eur Radiol* 27:3509–3522.

<https://doi.org/10.1007/s00330-016-4653-3>

Anexo.

Secuencias de los amplicones

Amplicones *IDH1*

| Paciente | Fuente | Secuencia |
|----------|--------|--|
| VLV | Sangre | CAATACAAATGAGCACCATACGAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAAATATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTCATGCTATGGGGATCAAGTAAGTCATGTTGGCAATAATGTGAA |
| | Glioma | GGGACCCCAAATGGCACCATACGAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAAATATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTCATGCTTATGGGGATCAAGTAAGTCATGTTGGCAATAATGTGAA |
| MAN | Sangre | GGTGACCCCAAATGGCACCATACGAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTA TCTGCAAAAAATATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTCATGCTTATGGGGATCAAGTAAGTCATGTTGGCAATAATGTGAACAACCTGAACTCCTCAACCAAA |
| | Glioma | GGTATCTTAATGGCACCATACGAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAAATATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTCATGCTATGGGGATCAAGTAAGTCATGTTGGCAATAATGTGAA |
| RSG | Sangre | CTGACACAATGGCACCATACGAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAAATATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTCATGCTTATGGGGATCAAGTAAGTCATGTTGGCAATAATGTGAA |
| | Glioma | TTTTTCACAAATGAGCACCATACGAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAAATATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCATCATGCTTATGGGGATCAAGTAAGTCATGTTGGCAATAATGTGAA |
| RHC | Sangre | TTAACCCAAAATGGCACCATACGAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAAATATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTCATGCTTATGGGGATCAAGTAAGTCATGTTGGCAATAATGTGAA |
| | Glioma | TTTATACAATGGCACATACGAATATTCTGGGTGGCACGGTCTTCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAAATATCCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTCATGCTTATGGGGATCAAGTAAGTCATGTTGGCAATAATGTGAA |

En la biopsia del paciente RSG encontramos el SNP rs121913499, que cambia el codón 132 **CGT** (arginina) por **CAT** (histidina).

En la biopsia del paciente RHC encontramos un SNP sinónimo no registrado que codifica cisteína con un cambio en el codón 146 de **GGT** por **GGC**.

Amplicones *IDH2*

| Paciente | Fuente | Secuencia |
|----------|--------|---|
| VLV | Glioma | TGGTATCCTGGGGGGGATGTCTTCCGGGAGCCCATCATCTGCAAAAACATCCCACGCCTAGT CCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCAGGCACGCCCATGGCGACCAGGTAGGCCAGG GTGGAGAGGGGATCCACTGACCTGGGCACCA |
| | Sangre | TGGTCATCCTGGGGGGGATGTCTTCCGGGAGCCATCATCTGCAAAAACATCCCACGCCTAGT CCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCAGGCACGCCCATGGCGACCAGGTAGGCCAGG GTGGAGAGGGGATCCACTGACCTGGGCACA |
| MAN | Glioma | TGGTCATCCTGGGGGGGCTGTCTTCCGGGAGCCATCATCTGCAAAAACATCCCACGCCTAGT CCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCAGGCACGCCCATGGCGACCAGGTAGGCCAGG GTGGAGAGGGGATCCACTGACCTGGGCACCA |
| | Sangre | TGGTATCGTGGGGGGGATGTCTTCCGGGAGCCATCATCTGCAAAAACATCCCACGCCTAGTC CCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCAGGCACGCCCATGGCGACCAGGTAGGCCAGGG TGGAGAGGGGATCCACTGACCTGGGCACT |
| RSG | Glioma | TGGTATCCTGGGGGGGATGTCTTCCGGGAGCCCATCATCTGCAAAAACATCCCACGCCTAGT CCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCAGGCACGCCCATGGCGACCAGGTAGGCCAGG GTGGAGAGGGGATCCACTGACCTGGGCACCA |
| | Sangre | TGGGTATCATGGGGGGGATGTCTTCCGGGAGCCATCATCTGCAAAAACATCCCACGCCTAGT CCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCAGGCACGCCCATGGCGACCAGGTAGGCCAGG GTGGAGAGGGGATCCACTGACCTGGGCACT |
| RHC | Glioma | TGGGCATCATGGGGGGGATGTCTTCCGGGAGCCATCATCTGCAAAAACATCCCACGCCTAGT CCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCAGGCACGCCCATGGCGACCAGGTAGGCCAGG GTGGAGAGGGGATCCACTGACCTGGGCAC |
| | Sangre | TGGTATCATGGGGGGGCTGTCTTCCGGGAGCCATCATCTGCAAAAACATCCCACGCCTAGTC CCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCAGGCACGCCCATGGCGACCAGGTAGGCCAGGG TGGAGAGGGGATCCACTGACCTGGGCACCA |

Las 4 parejas de secuencias son idénticas lo cual corresponde a alelos de tipo silvestre en el gen *IDH2* de cada paciente.

Amplicones *MGMT*

| Paciente | Sentido | Secuencia |
|----------|---------|--|
| VLV | F | GGGACTTCTAAGCGCGTGCGCATATGAAGGGACGAATTTTTTATGTAAAAGAGTTTAGGGT AGCGGCGATGACAGGAAGTTATGATCGGTGTGTTGGTAATTAGTGAGGATGCGTAGATTGT TTTAGGTTTTGGCGTCGTCTATTGGGTATGCGTTGATTTGGTGGGTGGGAATATTTTGT TTTTTTGGGTTAA |
| | R | GGTAAATTAAGGTATAGAGTTTTCAGGCGGAAGTTGGGAAGGCGTCTTCTGTTTTGTATTGG TCGAAGGGTTATTGGTTAGGCGTACAGGGTATCGGTCTTGTGAGGAGTAGGAAACA AGGGGTGCGGAATTAAGGTGGTGGTAATAATGGGATAGAGAGTACAGAGTGTGATATTGT AGCTGAAAGCAC |
| MAN | F | CTAGCCTAATTTGCGGGTGCGAACAAGATCAGAAGATTTTTTAGGTAAAAAGAGTTTAGG GTAGCGGCGATGACCGGAGGATTAGGGTGGGTGTGTTGGTGTAGGAGTGGTAGATT GTTTTAGGTTTTGGCGTCTCTATTGGGTATCGTTGATTGGTGGGAATATTTTGT TTTTTTTTGGGTTT |
| | R | GGTAAATTAAGGTATAGAGTTTTCAGGCGGAAGTTGGGAAGGCGTCTTCTGTTTTGTATCGG TCGAAGGGTTATTGGTTCAGGCGTATAGGGTAGCGGCGTTGTGAGGAGACCCCGGGT GGCGTGGGAGTTTACGTGGTGGTACTAATGGTAGTAGAGTCTGAGTGTGCTATGT ACGTGCAAAATAAC |
| RSG | F | CGGATGACCATCCGCAGTGTAGAGTATGTATCGGAAGATGTGTTATTAAGTTTTGAAAGAGC AGTATAGGGTAGCGGCGTTGTGAGGAGATTAGGGTGGGTGTGTTGGTGTAGTGGAGGAT CGGTAGATTGTTTTAGGTTTTGGTGTCTCTATTGGGTATGCGTTGATTTGGTTGGTGGG AATATTTTGTTTTTTTGGGTTT |
| | R | GGTAAATTAAGGTATAGAGTTTTAGGCGGAAGTTGGGAAGGCGTCTTCTGTTTTGTATCGG TCGAAGGGTTATTGGTTCAGGCGTATAGGGTAGCGGCGTTGTGAGGAGATTAGGGTACCG CGTGTGGTGTGTTAGTGTGGTATGCTTATGATGAGTATAGAGTCTGCAAGTGTTCCTGAAG TTACAAGATAATCCAAAC |
| RHC | F | CCCAACCGAGACCAGCGCATGCTTGCAAGTAATATAGTAGTTTTTCTGTAAAAGAGTA TAGGGAGTGGTGTGTTGGAGGATTAGGGCTGGTGTGTTGGTGTAGTGGAGGATGTGTAG ATTGTTTTAGGTTTTGGTCTGCTGTATTGGGTATGTGTTGATTTGGTTGGTGGGAATATT TTGTTTTTTTTGGGTTA |
| | R | TGGGTAATTAAGGTATAGAGTTTTAGGTGGAAGTTGGGAAGGTGTTGTTGGTTTGTATT GGTTGAAGGGTTATCTGGGTTAGGTGTATAGGGTACTGCTGTTGCTGGAGGATTAAGGCGG TGTGTTGGTGTGTTAGGATTGGTAAATTGATAAATAGAGGTTCTGTGTGTTTTATACCTGT ATTATAACCCCC |

F, forward. R, reverse.

En amarillo resaltamos las islas metiladas de cada secuencia.

Artículo de revisión publicado

Álvarez-Guerrero AF, López-Revilla R (2021)

Biomarkers of gliomas and their impact on diagnosis, prognosis, and treatment. Rev Mex Neurocienc 22:22–29. <https://doi.org/10.24875/rmn.20000029>

Revista Mexicana de Neurociencia



REVIEW ARTICLE

Biomarkers of gliomas and their impact on diagnosis, prognosis, and treatment

Argenis F. Álvarez-Guerrero and Rubén López-Revilla*

Molecular Biology Division, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

Abstract

Tumors of the central nervous system (CNS) are due to the abnormal growth of cells in the brain or spinal cord that can become malignant and spread by metastases. Gliomas are the most frequent malignant tumors of the CNS, characterized by their heterogeneity and invasiveness. The high lethality of gliomas is due, among other causes, to the low efficacy of current treatments. The few biomarkers effective for the classification, prognosis, and treatment of the various types of gliomas are a useful tool for their management. New markers are currently being sought to make a more accurate diagnosis and for their potential as therapeutic targets. In this review, we describe the traditional biomarkers and other biomarkers that could be used to improve the diagnosis, prognosis, and treatment of gliomas.

Key words: Glioma. Biomarker. Diagnosis. Prognosis. Treatment.