

ISSN 0120-4137

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Barrera LM, Ortiz LD, Grisales H, Rojas M, Camargo M. Citometría de flujo en reticulocitos de sangre periférica como indicador de inestabilidad cromosómica en pacientes con gliomas de alto grado. *Biomédica*. 2018;38(3).

Recibido: 25-04-17

Aceptado: 15-03-18

Publicación en línea: 22-03-18

Citometría de flujo en reticulocitos de sangre periférica como indicador de inestabilidad cromosómica en pacientes con gliomas de alto grado

Flow cytometry in peripheral blood reticulocytes as marker of chromosome instability in high-grade gliomas patients

Citometría de flujo e inestabilidad cromosómica en gliomas

Lina Marcela Barrera ¹, León Darío Ortiz ^{1,2}, Hugo Grisales ³, Mauricio Rojas ⁴,
Mauricio Camargo ¹

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

² Instituto de Cancerología - Clínica Las Américas, Medellín, Colombia

³ Grupo de Investigación Demografía y Salud, Facultad Nacional de Salud Pública,
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁴ Unidad de Citometría de Flujo y Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética
(GICIG), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Correspondencia:

Mauricio Camargo, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia,
carrera 53 # 61-30, torre 2, laboratorio 432, Medellín, Colombia.

Teléfono (57-4) 2196528

mauricio.camargo@udea.edu.co

Contribución de los autores:

Lina Marcela Barrera: toma de muestras, estandarización de la técnica, ensayos experimentales, análisis estadísticos y análisis de resultados

León Darío Ortiz: diseño de la logística para el estudio clínico de los pacientes.

Hugo Grisales: análisis estadísticos.

Mauricio Rojas: análisis de los datos y resultados de la citometría de flujo.

Mauricio Camargo: concepción y diseño del estudio, supervisión el desarrollo del trabajo y análisis de los datos.

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Introducción. La cuantificación de inestabilidad cromosómica, es un parámetro importante para evaluar genotoxicidad y radiosensibilidad. Las técnicas convencionales requieren cultivos celulares y/o laboriosos análisis microscópicos de cromosomas o núcleos. Sin embargo, la citometría de flujo seleccionando reticulocitos, ha surgido como alternativa para estudios *in vivo* acortando los tiempos de análisis e incrementando hasta en 20X el número de células-blanco analizables.

Objetivos. Estandarizar los parámetros de citometría de flujo requeridos para seleccionar y cuantificar reticulocitos micronucleados (MN-RET) a partir de muestras de sangre periférica; y cuantificar la frecuencia de esta subpoblación anormal como medida de inestabilidad citogenética en sendas poblaciones de voluntarios sanos (n=25) y pacientes (n=25) recién diagnosticados con gliomas de alto grado y antes de iniciar terapias.

Materiales y métodos. Las células sanguíneas se marcaron con anti-CD71-PE (para reticulocitos), anti-CD61-FITC (para exclusión de plaquetas) y yoduro de propidio (para detectar DNA en reticulocitos). La fracción celular MN-RET^{CD71+} se seleccionó y cuantificó con citómetro FACS Canto-II.

Resultados. Se describe en detalle la estandarización de los parámetros citométricos, con énfasis en la selección y cuantificación de la subpoblación celular MN-RET^{CD71+}. Se establecieron los niveles basales de MN-RET^{CD71+} en la población control; y en pacientes se encontró un incremento de 5,2 veces antes de iniciar tratamiento (p<0,05).

Conclusión. Los resultados evidencian la utilidad de la citometría de flujo acoplada a la marcación de RET^{CD71+} como método eficiente para cuantificar

inestabilidad cromosómica *in vivo*. Finalmente, se discuten posibles razones para el incremento de micronúcleos en células RET^{CD71+} en pacientes con gliomas.

Palabras clave: citometría de flujo; reticulocitos; inestabilidad cromosómica; pruebas de micronúcleos; glioma.

Introduction: Quantification of chromosomal instability is an important parameter to assess genotoxicity and radiosensitivity. Most conventional techniques require cell culturing or laborious microscopic analyses of chromosomes or nuclei.

However, a flow cytometric alternative has been developed that allows *in vivo* studies expediting the analytical procedures and increasing up to 20X the number of target cells to be analyzed.

Objective: To standardize the flow cytometric parameters for selection and quantification of micronucleated reticulocytes^{CD71+} (MN-RET) from freshly drawn peripheral blood; and to quantify the frequency of this abnormal cell subpopulation as a measure of cytogenetic instability in populations of healthy volunteers (n =25) and patients (n=25) with newly diagnosed high-grade gliomas before the onset of treatment.

Materials and methods: Blood cells were methanol-fixed and labeled with anti-CD-71-PE (for reticulocytes), antiCD-61-FITC (for platelets exclusion) and propidium iodide (for DNA detection in reticulocytes). The MN-RET^{CD71+} cell fraction was selected and quantified with a FACS-Canto-II flow cytometer.

Results: The standardization of cytometric parameters is described in detail, with emphasis in the selection and quantification of the MN-RET^{CD71+} cellular fraction. The micronuclei basal level was established in healthy controls; and in patients a 5.2-fold increase before the onset of treatment was observed ($p < 0,05$).

Conclusion: The data shows the usefulness of flow cytometry coupled with anti-CD-71-PE and antiCD-61-FITC labeling in circulating reticulocytes, as an efficient and high resolution method to quantify chromosome instability *in vivo*. Finally,

possible reasons for the higher average of micronuclei in RET^{CD71+} cells from untreated high-grade glioma patients are discussed.

Key words: flow cytometry; reticulocytes; chromosome instability; micronucleus tests; glioma.

La cuantificación de inestabilidad cromosómica, es un parámetro importante para estimar radiosensibilidad y para evaluar genotoxicidad relacionada a exposición terapéutica, ocupacional, ambiental o accidental. Los métodos convencionales emplean visualización microscópica de daños cromosómicos o nucleares, sin o con precultivo celular, como es el caso del ensayo clásico de alteraciones cromosómicas en linfocitos en división, o el de micronúcleos (MN) en linfocitos binucleados (1-5) Su amplio uso y validez son incuestionables, solo que demandan laboriosos análisis visuales de al menos un centenar de mitosis o dos mil células interfásicas por muestra, dificultando la rápida obtención de resultados. De ahí que la automatización o el empleo de la citometría de flujo, hayan surgido como alternativas para acortar los tiempos de análisis (3,6,7), y aumentar el poder estadístico incrementando hasta en 20X el número de células analizables/muestra, como se evidencia en el presente reporte.

Los eritroblastos son una población celular mitóticamente activa precursora de eritropoyesis con nicho en médula ósea, y sus núcleos se expulsan pocas horas después de la última mitosis. De allí se generan células enucleadas denominadas eritrocitos inmaduros o reticulocitos. Y fueron estas células enucleadas recién producidas en la médula ósea, el blanco de observación para el test original *in vivo* de MN en extendidos de médula ósea de ratones, estandarizado por Schmid (8,9). En humanos los reticulocitos constituyen una fracción minoritaria de los eritrocitos circulantes, lo cual dificulta su empleo para el test de MN mediante microscopía. En cambio, la citometría de flujo facilita su detección mediante la marcación diferencial de los reticulocitos (RET) utilizando el anticuerpo anti-CD-71, el cual detecta la transferrina que es la proteína encargada de transportar el hierro y es

específica para esta población. Y dado que los reticulocitos tienen tamaños similares a las plaquetas, éstas se pueden diferenciar, filtrar y descartar empleando anti-CD-61 y citometría de flujo (10).

En contraste, la evaluación de genotoxicidad a nivel cromosómico en linfocitos de sangre periférica ha involucrado tradicionalmente cultivos celulares en presencia de un mitógeno, mientras que el ensayo de micronúcleos basado en RET no necesita este requerimiento; además, una vez estandarizada la metodología, las células obtenidas no requieren pre-cultivo y son procesadas de inmediato siguiendo procedimientos mínimos (3). Ello serviría como método práctico y expedito para evaluaciones *in vivo* de inestabilidad cromosómica constitutiva o daño genómico inducido en personas expuestas a genotóxicos potenciales por razones terapéuticas (ej., radioterapia), ocupacionales, ambientales o accidentales. Eventualmente, también se podría aplicar para evaluar radiosensibilidad en pacientes candidatos a radioterapia.

El presente estudio se diseñó para (a) estandarizar y adaptar la metodología propuesta por Dertinger et al. (11) para cuantificar MN en células RET^{CD71+} mediante citometría de flujo de tres canales, (b) establecer los niveles basales de MN-RET de una población de voluntarios sanos, (c) aplicarla para cuantificar la frecuencia *in vivo* de MN en sangre periférica, en una población de pacientes con gliomas de alto grado, como medida de inestabilidad citogenética pre-tratamiento.

Materiales y métodos

Reactivos

Metanol absoluto (Merck, USA, I5680090); heparina sódica (Grand Pharma); solución de sales de Hank (HBSS-H1387), RNAsa (R5000) y el yoduro de propidio

(P4170) marca Sigma (St Louis, MO, USA); y los anticuerpo anti-CD71 humano (Clon T56/14), y anti-CD61 humano (Clon F11) marca Invitrogen (Camarillo, CA, USA).

Población de estudio

Previo consentimiento informado y con la aprobación del Comité de Ética Independiente del Instituto de Cancerología de la Clínica Las Américas (ICCLA) y del Comité de Bioética de la Sede de Investigación de la Universidad de Antioquia (CBE-SIU), en el estudio se incluyeron 50 individuos voluntarios: 25 personas sanas que fueron reclutadas en la Universidad de Antioquia y 25 pacientes recién diagnosticados con Glioma de Alto Grado contactados en el Instituto de Cancerología de la Clínica Las Américas en un lapso de 12 meses. A cada individuo se le tomó una muestra de 4 mL de sangre venosa en tubo Vacutainer® con heparina. Los consentimientos informados fueron firmados por los voluntarios sanos antes de la toma de la muestra; y los pacientes, después del diagnóstico y previa ilustración por el médico (L.D.O.). Los pacientes fueron pareados por edad (\pm 5 años) y género.

Fijación de la muestra

Se inició con la adición de 1 mL de sangre heparinizada a un tubo cónico con 5 mL de diluyente (500 unidades de heparina/mL HBSS); luego se fijó la muestra adicionando 450 μ L de la dilución anterior, en 5 mL de metanol frío (-80°C), se agitó en vórtex 20 segundos y se almacenó a -80°C por 24 horas.

Marcaje con yoduro de propidio y anticuerpos conjugados

Después de la fijación, 1 mL de la muestra se agregó a un tubo cónico con 13 mL de HBSS, se centrifugó 5 min a 600g y se descartó el sobrenadante por

decantación; luego se agitó brevemente para resuspender el botón celular y se adicionaron 20 μ L de esta suspensión de células a un tubo de citometría (polipropileno, 12 x 75 mm) que contenía 75 μ L de solución RNAsa (980 μ L HBSS y 20 μ L RNAsa 1mg/ mL). Las muestras fueron analizadas usando tres marcajes: antiCD-71-PE (para la identificación de RET), antiCD-61-FITC (para la exclusión citométrica de las plaquetas) y yoduro de propidio para cuantificar la cantidad relativa de DNA. Se agregaron 5 μ L de cada anticuerpo siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las muestras se incubaron consecutivamente durante 30 min a 4°C y luego 60 min a temperatura ambiente; pasado este tiempo se lavaron con 3 mL de HBSS y se centrifugaron 5 min a 600g; luego se adicionó 1 mL de solución de yoduro de propidio (PI) (1,25 μ g/ mL de PI en HBSS). Finalmente, se almacenaron 15 min a 4°C y se leyeron en citómetro de flujo FACS-Canto-II (BD-Immunocytometry System, San Jose, CA). Las células fueron excitadas con un láser de 488 nm y se analizó la emisión de los fluorocromos a 530/30 nm (FITC), 585/42 (PE) nm y 670/LP nm (yoduro de propidio). La adquisición de eventos para cada muestra procedió hasta que el número de RET^{CD71+} fuera \geq 80.000 o hasta que se agotara el volumen de la muestra. El porcentaje de RET^{CD71+PI+} se determinó para cada muestra de sangre.

Cálculo de la compensación

Para calcular la matriz de compensación, se ajustaron los voltajes de tamaño y granularidad y fluorescencia de las muestras con una muestra de células sin tinción. Sobre éstos se calculó la matriz de compensación utilizando las “Compeads” revestidas con anticuerpos de captura anti-Mouse Ig κ mezcladas con cantidades equivalentes de perlas de control negativo. El control de compensación

para PI se construyó utilizando el control negativo de las Compbeas mezclados con núcleos de eritrocitos de pollo (BD CEN). La matriz se calculó de forma automática en el BD FACSDiva versión 6.1.3. La estabilidad en los índices de tinción se verificó en al menos tres momentos independientes. La estabilidad en los voltajes y la eficiencia de los detectores se verificó mediante las esferas, “BD™ Cytometer Setup and Tracking” (CST). Los parámetros de lectura estuvieron dentro de las variantes aceptadas para el instrumento, estimados mediante las gráficas de Levey-Jennings construidas a partir de la señal de los detectores implicados en el análisis de los MN.

Bio-estándares para verificación de la compensación

En los análisis de citometría, se hizo una verificación de la corrección del derramamiento espectral entre los fluorocromos, haciendo tinciones individuales para cada marcador de superficie basados en lo descrito por Dertinger et al. (2002, 2003) y Torous et al. (2000) (12-14). Esta misma estrategia permitió definir la positividad para las células en cada región. Para cada individuo se prepararon cuatro muestras. La primera contenía 20 µL de la muestra con yoduro de propidio, la segunda antiCD-71-PE y la tercera antiCD-61-FITC; con éstos se hizo la corrección de la compensación y con el cuarto tubo, que contenía ambos anticuerpos, se analizó el porcentaje de células CD61-CD71+ PI+ después de haber excluido células 2n y los agregados, mediante una región definida sobre (FSC-A vs FSC-H); luego se determinó la frecuencia de MN en la fracción de RET^{CD71+} (MN-RET).

Adquisición de datos y análisis estadísticos

Para la estimación de las frecuencias de MN-RET se utilizó el programa de citometría de flujo FlowJo 7.6.2. En cuanto al análisis estadístico, en la parte univariada se acudió a los indicadores clásicos de resumen, a saber, media, mediana, desviación estándar, coeficiente de variación, para variables cuantitativas y porcentajes, para variables cualitativas. En el análisis bivariado, dada la no normalidad del desenlace en su escala original (vía prueba de Shapiro Wilk) se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney para determinar la diferencia en los rangos promedios del porcentaje de MN-RET con cada uno de los factores que ameritaron valoración. En el análisis multivariado, se construyó un modelo de regresión logística explicativo tomando variable dependiente el porcentaje de MN-RET (Normal-Alto), advirtiéndose que la categorización se originó de segmentar la variable original con nivel de medición de razón, el porcentaje de MN-RET, por la media, como criterio estadístico. Se consideraron como variables independientes aquellas que el estado del arte ha revelado como importantes por su efecto sobre el desenlace. La finalidad en la construcción del modelo de regresión logística estribó en controlar el efecto presuntamente confusor de cada una de las variables incluidas en el modelo sobre las otras. El programa SPSS v.22®, fue la herramienta que permitió la obtención de los resultados estadísticos anteriormente esbozados.

Resultados

Selección de la población de análisis

Inicialmente se descartaron los eventos celulares mayores a $2n$ mediante los parámetros de exclusión FSC-H e incorporación de yoduro de propidio (Figura 1a);

de allí se tomaron los eventos menores a $2n$ (P1) y se realizó la exclusión de agregados (P2) a través de los parámetros FSC-H y FSC-A (Figura 1b). En la figura 1c, se observa la distribución de las poblaciones celulares en cuanto a tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A). Posteriormente, debido a que las plaquetas presentan similitud en tamaño a la porción de reticulocitos inmaduros, se utilizó el anticuerpo anti-CD61 para excluir plaquetas (Figura 1d), y se seleccionó la población correspondiente a los RET^{CD71+} (Figura 1e). Finalmente, a partir de la población seleccionada, se cuantificaron los eventos con mayor cantidad de PI, cuadrante Q2-2, que corresponde a los MN-RET (Figura 1f).

Medición de la población MN-RET

Las muestras de los 50 individuos (25 pacientes y 25 controles) fueron analizadas para la detección de las frecuencias de RET^{CD71+} y MN-RET. El número de eventos únicos totales evaluados por individuo osciló aproximadamente entre 28.000 y 520.000, de los cuales alrededor del 1% pertenecía a la población total de RET. Basados en el valor promedio de RET^{CD71+} para estos individuos y también en los análisis con los cuales se midieron las frecuencias de RET establecidos sobre la fluorescencia asociada a ácidos nucleicos, se estimó que el anticuerpo anti CD-71-PE marcó aproximadamente entre el 98-100% de la población de reticulocitos.

Comparación de las frecuencias de MN-RET entre pacientes y controles

Inicialmente se analizó el porcentaje de presencia de MN-RET en las muestras de voluntarios sanos el cual varió entre 0,00 – 8,48% con una mediana de 2,31% y un rango intercuartil (I.Q.= 3,51). En cambio, en los pacientes con cáncer (gliomas de alto grado), las frecuencias de MN-RET presentaron mayores valores a los

encontrados en los controles (0,384 – 61,76%) con una mediana de 12,45% y un I.Q.= 18,325. Los datos de frecuencias se presentan en el cuadro 1.

En la figura 2 se presenta una gráfica bivariada que compara la frecuencia de los RET^{CD71+} entre un voluntario sano (control) (figura 2a) y un paciente diagnosticado con glioma de alto grado antes del tratamiento (figura 2b); como se observa en el cuadrante Q2-3, el número de eventos MN-RET es mucho más elevado en el paciente que en el control.

En el análisis multivariado, solo los casos tuvieron un efecto significativo sobre el porcentaje de MN-RET; de hecho, el porcentaje de riesgo de MN-RET-alto (por encima de la mediana) fue 93,9% más bajo en los controles que en los casos, ajustando para las variables: ser hombre, consumo de alcohol/tabaco, no consumo de antioxidantes, uso de medicamentos y ser adulto mayor (cuadro 2). Aunque las demás variables constitutivas del modelo no tuvieron significación estadística, vale mencionar que el riesgo de un porcentaje alto de MN-RET, fue 68% mayor en los hombres que en las mujeres, y 5,3% mayor en adultos mayores sobre los adultos jóvenes, controlado por las variables mencionadas. Finalmente, el análisis de las variables independientes en su conjunto muestran que ellas solo explican el porcentaje de MN-RET en un 42,3%.

Discusión

La detección de MN por citometría de flujo en reticulocitos humanos (RET), se basa en marcar la población de interés y cuantificar la cantidad de MN en estas células de manera específica, a través de un protocolo de fijación y marcaje celular diferencial en muestras de sangre periférica. Los procedimientos descritos en este artículo, son simples de ejecutar y están basados en colorantes de ácidos

nucleicos con alta especificidad por el DNA, así como los reportados por Dertinger et al. (2003). La técnica no incluye la separación física de los eritrocitos CD71+ sino el uso de anticuerpos contra CD71 marcados con fluoróforos, que se utilizan para distinguir la fracción inmadura de los eritrocitos en el citómetro de flujo (6,12,13).

La eficiencia con la cual el bazo humano remueve de la circulación los eritrocitos que contienen MN, se ha considerado un obstáculo para utilizar la medida de MN-RET en sangre periférica como un indicador confiable de daño citogenético (12,13). Sin embargo, los datos presentados en este estudio, sugieren que puede ser posible evaluar el daño citogenético en forma de MN en individuos no esplenectomizados; esto se hace posible, a través de un sistema de análisis de alto rendimiento como lo es la citometría de flujo, donde se tiene en cuenta la rareza de la subpoblación RET^{CD71+} y la baja ocurrencia de MN.

Basados en los resultados obtenidos y la efectividad de este procedimiento, se puede determinar que los reticulocitos recién formados en sangre periférica representan un blanco celular alternativo que muestra muchas ventajas. Esta técnica requiere bajos volúmenes sanguíneos, incluye muy pocos pasos de procesamiento de la muestra debido a que la cosecha de células es mínimamente invasiva; los requerimientos del equipo son poco sofisticados y se realiza un conteo automatizado imparcial donde el análisis de muestras de sangre para la detección de MN excede tasas de hasta 1000 eventos por segundo, lo cual equivale a un gran número de células si se compara con microscopía óptica, donde se analizan máximo 2000 células binucleadas por muestra (14). Además,

se cuantifica simultáneamente el % RET y % MN-RET; y el tiempo requerido para coleccionar los datos en el citómetro es de ~20 min por muestra (13).

Aunque la citometría de flujo da una indicación de la medida de inestabilidad genómica a través de la frecuencia de MN-RET en una población, la única desventaja que presenta es que el ensayo no provee información sobre la composición cromosómica del MN, y no distingue entre los diferentes mecanismos de acción de los inductores (clastogénicos o aneugénicos); además, el ensayo no determina si una célula tiene un MN o varios, como si puede ser determinado por microscopia convencional (6).

Las muestras de sangre de 25 voluntarios sanos fueron importantes para estimar el nivel basal de los valores de RET y MN-RET. Aunque los porcentajes de MN-RET no son tan elevados para este grupo control (2,31%)(I.Q.= 3,51), el coeficiente de variación fue alto (79,46%); y análogo a lo reportado en otros estudios (1,3,15-17), se observó un rango variable en las frecuencias inter-individuales de MN tanto en voluntarios sanos como en pacientes, lo que indica variabilidad individual significativa, y que el conocimiento de los cambios espontáneos en las frecuencias de estos eventos es un indicativo para determinar los parámetros basales en la población.

Los análisis de covarianza demostraron que la variación en la frecuencia basal podría no estar relacionada con la edad y el género. Esto en contraste con otros estudios que sugieren efectos significativos de cada uno de estos factores en la incidencia de MN. Estas discrepancias pueden estar relacionadas con diferencias en las células blanco (eritroblastos vs linfocito) u otros factores inherentes a la variabilidad inter-individual (3,16).

Las frecuencias de MN en los pacientes con cáncer pre-tratamiento también fueron variables y más elevadas que las de los voluntarios sanos, con una mediana de 12,45% (I.Q.= 18,32) indicando la presencia en sangre circulante de factores genotóxicos de naturaleza aún desconocida y/o una posible susceptibilidad a padecer la enfermedad, como lo observado en otros estudios para diferentes tipos de cáncer (16-21). Los experimentos aquí descritos sugieren que los MN-RET^{CD71+} en sangre periférica podrían representar un posible biomarcador de susceptibilidad a desarrollar este tipo de neoplasias.

Una de las estrategias más prometedoras para la prevención del cáncer, es el desarrollo y validación de biomarcadores que puedan anticiparse al diagnóstico clínico. De hecho, los biomarcadores son instrumentos que ayudan a detectar personas de alto riesgo, y se pueden dividir en tres grupos: El primero, para definir la exposición a agentes carcinogénicos, el segundo para mostrar efectos biológicos y el tercero para dar información acerca de la susceptibilidad individual (21,22).

La base conceptual para el uso de MN como biomarcador de genotoxicidad y/o riesgo a cáncer (23), se fundamenta en el hecho de que las alteraciones citogenéticas hacen parte del fenotipo tumoral, soportando la hipótesis que el daño cromosómico está involucrado directamente en la etiología del cáncer (21,22). Sin embargo, es difícil establecer una relación causal entre el aumento en el número de MN y el riesgo de cáncer, pues puede ser consecuencia de la enfermedad (causalidad reversa) o el reflejo de una susceptibilidad individual a eventos que generan inestabilidad genómica (16,22).

La asociación entre frecuencias elevadas de MN y el riesgo a desarrollar cáncer no está confinado a cánceres en sitios específicos (22). Sin embargo, estas frecuencias en pacientes con cáncer, reflejan la acumulación de alteraciones genéticas, causadas por factores genotóxicos endógenos y exógenos, así como variaciones individuales en la susceptibilidad a estos factores (16,21).

Hasta hoy, las amplias investigaciones de biomarcadores en tumores cerebrales han presentado pocas opciones útiles para la práctica clínica, por lo que se hace necesario buscar y generar nuevas opciones de marcadores tumorales, como por ejemplo, los basados en sangre periférica o biopsias líquidas, los cuales resultarían más prácticos que los actuales, debido a que se pueden realizar sin necesidad de repetir la cirugía o biopsias en los pacientes. Sin embargo, la investigación de biomarcadores en gliomas de alto grado, es todo un reto, dado la rareza y la diversidad genética de estos tumores. Además, comparado con otros cánceres, la transición a la práctica clínica se ha visto obstaculizada por las bajas tasas de detectabilidad.

Finalmente, cabe destacar que la detección de MN por citometría de flujo en reticulocitos humanos es una técnica moderna, rápida y eficiente, de importancia para evaluar genotoxicidad en MN-RET a una escala de eficiencia-sensibilidad sin precedente. Los datos aquí suministrados, además soportan la hipótesis de que las frecuencias de MN-RET en sangre periférica pueden ser una alternativa de mayor sensibilidad a los análisis convencionales basados en la técnica de linfocitos binucleados, con el potencial de constituirse en una nueva herramienta validable como biomarcador para la predicción y detección temprana del cáncer.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por la Estrategia de Sostenibilidad 2013/2014 (Grupo GRC) del CODI – Universidad de Antioquia, y la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República (Proyecto 3640). Los autores agradecen a los donantes voluntarios y a la Unidad de Quimioterapia del Instituto de Cancerología de la Clínica Las Américas de Medellín por su asistencia en la obtención de las muestras de los pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores de este artículo expresan que no tuvieron conflictos de intereses durante la preparación de este documento ni para su publicación.

Financiación

Esta investigación fue financiada por la Estrategia de Sostenibilidad (Grupo GRC) del CODI – Universidad de Antioquia y la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República (Proyecto 3640).

Referencias

1. **Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S.** The Human MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 1999;428:271-83. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00053-8)
2. **Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al.** An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007;28:625-31. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>

3. **Dertinger SD, Miller RK, Brewer K, Smudzin T, Torous DK, Roberts DJ, et al.** Automated human blood micronucleated reticulocyte measurements for rapid assessment of chromosomal damage. *Mutat Res.* 2007;626:111-9. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.09.003>
4. **Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, de Sá Júnior P, Nozima BH, Ito ET, et al.** Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother.* 2015;72:74-82. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004>
5. **Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al.** Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011;26:125-32. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geq052>
6. **Balmus G, Karp NA, Ng BL, Jackson SP, Adams DJ, McIntyre RE.** A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. *Nat Protoc.* 2014;1:205-15. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.010>
7. **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
8. **von Ledebur M, Schmid W.** The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutat Res.* 1973;19:109-17. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(73\)90118-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(73)90118-8)
9. **Schmid W.** The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975;31:9-15. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8)
10. **Chen Y, Tsai Y, Nowak I, Wang N, Hyrien O, Wilkins R, et al.** Validating high-throughput micronucleus analysis of peripheral reticulocytes for

radiation biodosimetry: benchmark against dicentric and CBMN assays in a mouse model. *Health Phys.* 2010;98:218-27.

<https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3181abaae5>

11. **Dertinger SD, Torous DK, Hayashi M, MacGregor JT.** Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage. *Mutagenesis.* 2011;26:139-45.

<https://doi.org/10.1093/mutage/geq055>

12. **Dertinger SD, Torous DK, Hall NE, Murante FG, Gleason AE, Miller RK, et al.** Enumeration of micronucleated CD71-positive human reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat Res.* 2002;515:3-14.

[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00009-8)

13. **Dertinger SD, Chen Y, Miller RK, Brewer K, Smudzin T, Torous DK, et al.** Micronucleated CD71-positive reticulocytes: a blood-based endpoint of cytogenetic damage in humans. *Mutat Res.* 2003;542:77-87.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.08.004>

14. **Torous DK, Dertinger SD, Hall NE, Tometsko CR.** Enumeration of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood: a flow cytometric study. *Mutat Res.* 2000;465:91-9. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00216-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00216-8)

15. **Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, et al.**

HUman MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I.

Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen.* 2001;37:31-45.

[https://doi.org/10.1002/1098-2280\(2001\)37:1<31::AID-EM1004>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1098-2280(2001)37:1<31::AID-EM1004>3.0.CO;2-P)

16. **Chang P, Li Y, Li D.** Micronuclei levels in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker for pancreatic cancer risk. *Carcinogenesis*. 2010;32:210-5. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq247>
17. **Cao J, Liu Y, Sun H, Cheng G, Pang X, Zhou Z.** Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy. *Mutat Res*. 2002;504:85-90. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00082-9)
18. **Berg-Drewniok B, Weichenthal M, Ehlert U, Rummelein B, Breitbart EW, Rudiger HW.** Increased spontaneous formation of micronuclei in cultured fibroblasts of first-degree relatives of familial melanoma patients. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;97:106-10. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(96\)00364-0](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(96)00364-0)
19. **Scott D, Barber JB, Levine EL, Burrill W, Roberts SA.** Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *Br J Cancer*. 1998;77:614-20. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.98>
20. **Burrill W, Barber JB, Roberts SA, Bulman B, Scott D.** Heritability of chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a pilot study with the lymphocyte micronucleus assay. *Int J Radiat Biol*. 2000;76:1617-9. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600628>
21. **Bloching M, Hofmann A, Lautenschläger C, Berghaus A, Grummt T.** Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of

cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncol.* 2000;36:550-5. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(00\)00051-8](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(00)00051-8)

22. **Murgia E, Ballardin M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R.** Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case–control study. *Mutat Res.* 2008;639:27-34. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.10.010>
23. **Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al.** An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007;28:625-31. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>

Cuadro 1. Estadísticos descriptivos para % MN-RET. Valores de $p < 0,05$ indican diferencias significativas entre controles y pacientes.

% RET-MN Inicial	n	Mediana	Media	D.E.	C.V.	p
Casos	2 5	12,4 5	3,45	16,7 4	134	0,045
Controles	2 5	2,97	2,31	2,36	79,4 6	

Cuadro 2. Regresión logística multivariado para el porcentaje del riesgo de MN-RET según factores de interés.

Factores	Coeficiente	Error estándar	Wald	Sig.	OR	95% C.I. para OR	
						Inferior	Superior
Caso	-2,80	1,25	5,04	0,025	0,06	0,005	0,70
Ser hombre	0,52	0,93	0,32	0,575	1,69	0,27	10,50
Consumo de alcohol alto	-0,11	0,35	0,09	0,760	0,90	0,46	1,78
Consumo de cigarrillo alto	-0,11	0,53	0,04	0,839	0,90	0,32	2,52
No consume antioxidantes	-1,02	0,99	1,07	0,302	0,36	0,05	2,49
Si usa medicamentos	-1,03	0,94	1,20	0,274	0,36	0,06	2,26
Adulto mayor	0,05	0,03	3,15	0,076	1,05	0,995	1,12
Constante	1,88	2,30	0,67	0,413	6,53		

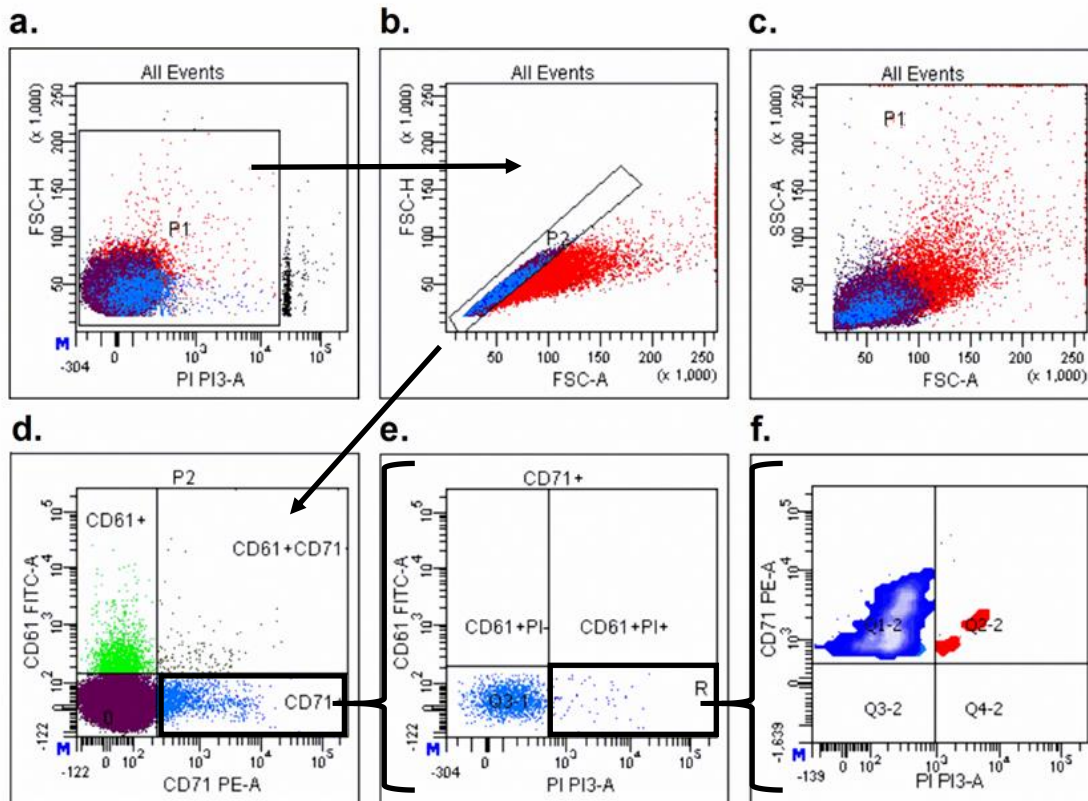
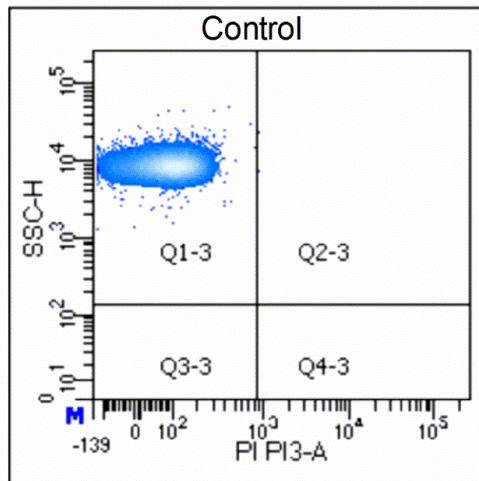


Figura 1. Gráficas bivaridas que ilustran la estrategia de “gating” usada para los análisis de muestras de sangre humana. a) Selección de eventos $2n$, P1; sobre el límite superior de esta región se observan las células $2n</math>, b) Exclusión de agregados, utilizando los parámetros de FSC-Area vs FSC-Height, c) Distribución de tamaño (FSC-A) vs granularidad (SSC-A) en color rojo los agregados y en azul los eventos únicos, d) Exclusión de plaquetas CD61+, e) Selección de población RET^{CD71+} , f) Cuantificación de MN-RET (CD71+PI+).$

a.



b.

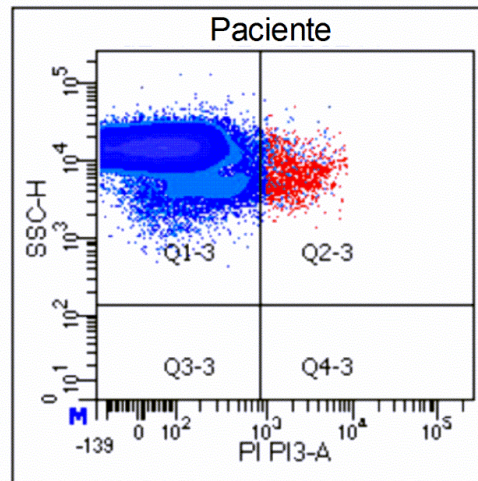


Figura 2. Gráfica Bivariada que ilustra la resolución de fluorescencia de la subpoblación RET^{CD71+} en sangre periférica de un voluntario sano (a) vs un paciente con glioma antes de iniciar terapia (b).