

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Biomarcadores genéticos en sangre, una nueva herramienta para el diagnóstico, pronóstico y supervivencia en pacientes con gliomas de alto grado

Fecha de recibido:

1 de julio de 2022.

Fecha de aprobación:

22 de febrero de 2023.

Forma de citar este

artículo: Ortiz LD, Rincón M, Agudelo PM, Arango JC, Camargo M, Barrera-Arenas LM. Biomarcadores genéticos en sangre, una nueva herramienta para el diagnóstico, pronóstico y supervivencia en pacientes con gliomas de alto grado. Med UPB. 2023;42(2):52-61. DOI:10.18566/medupb.v42n2.a07

Genetic biomarkers in blood, a new tool for diagnosis, prognosis, and survival in patients with high-grade gliomas / Biomarcadores genéticos no sangue, uma nova ferramenta para diagnóstico, prognóstico e sobrevida em pacientes com gliomas de alto grau

León Darío Ortiz Gomez^{1,2,3}, Melisa Rincón Medina⁴, Piedad Matilde Agudelo Flórez⁵, Juan Carlos Arango⁶, Mauricio Camargo¹, Lina Marcela Barrera-Arenas^{1,7}.

RESUMEN

Durante mucho tiempo, la clasificación de los tumores del sistema nervioso central (SNC) se ha basado en hallazgos histológicos respaldados por pruebas complementarias, como la inmunohistoquímica, establecidas en tejidos. La quinta edición de la clasificación de tumores del SNC de la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicada en 2021 (SNC-5) incorpora numerosos marcadores moleculares con utilidad clínico-patológica que son importantes para una clasificación más precisa de las neoplasias del SNC. Ello permiten ayudar a definir los gliomas difusos del adulto, oligodendroglioma mutado para el gen de la IDH (isocitrato deshidrogenasa láctica), con codeleción 1p/19q grados 2 a 3, astrocitoma mutado para IDH sin codeleción 1p/19q, grados 2 a 4 y glioblastoma (GBM) silvestre para IDH. La mediana de sobrevida en los pacientes con GBM es de solo 14.6 meses, debido a la resistencia al protocolo de terapia más utilizado en el mundo, el cual involucra cirugía, radioterapia y quimioterapia con temozolamida (TMZ), un potente alquilante genotóxico. Los criterios de selección del tratamiento y la estimación del pronóstico en pacientes con esta enfermedad son clínico-patológicos. En los últimos años se reportaron numerosas alteraciones moleculares que amplían la comprensión de la biología de estos tumores, pero solo unas pocas influyen como biomarcadores en la toma de decisiones clínicas y del tratamiento. En este artículo se revisan las alteraciones moleculares reportadas para gliomas de alto grado en sangre periférica, también se resalta la importancia de estandarizar nuevos biomarcadores junto a los hallazgos histológicos para mejorar el conocimiento de estos tumores.

Palabras clave: diagnóstico; genética; glioma; pronóstico; sangre.

ABSTRACT

For a long time, the classification of central nervous system (CNS) tumors has been based on histological findings supported by complementary tests, such as immunohistochemistry, established in tissues. The fifth edition of the World Health Organization (WHO) Classification of Tumors of the Central Nervous System, published in 2021 (CNS-5), incorporates numerous molecular markers with clinical-pathological utility that are important for a more accurate classification of CNS neoplasms. These markers help to define adult diffuse gliomas, including IDH-mutant oligodendroglioma with 1p/19q codeletion (grades 2-3), IDH-mutant astrocytoma without 1p/19q codeletion (grades 2-4), and wild-type IDH glioblastoma (GBM). The median survival in patients with GBM is only 14.6 months, primarily due to resistance to the most widely used treatment protocol worldwide, which involves surgery, radiotherapy, and chemotherapy with temozolomide (TMZ), a potent genotoxic alkylating agent. The selection criteria for

- 1 Grupo Genética, Regeneración y Cáncer (GRC), Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- 2 Doctorado Ciencias de la Salud, Escuela de Graduados, Universidad CES. Medellín, Colombia.
- 3 Instituto de Cancerología - Clínica Las Américas (AUNA). Medellín, Colombia.
- 4 Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Remington. Medellín, Colombia.
- 5 Escuela de Graduados, Grupo Ciencias Básicas, Universidad CES. Medellín, Colombia.
- 6 Instituto de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- 7 Grupo de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Remington. Medellín, Colombia.

treatment and the estimation of prognosis in patients with this disease are predominantly based on clinical and pathological factors. In recent years, numerous molecular alterations have been reported, expanding our understanding on the biology of these tumors. However, only a few of these molecular alterations serve as biomarkers that influence clinical decision-making and treatment strategies. This article reviews the molecular alterations reported in peripheral blood for high-grade gliomas and emphasizes the importance of standardizing new biomarkers alongside histological findings to enhance our knowledge of these tumors.

Keywords: diagnosis; genetics; glioma; prognosis; blood.

RESUMO

Por muito tempo, a classificação dos tumores do sistema nervoso central (SNC) baseou-se em achados histológicos respaldados por exames complementares, como a imunohistoquímica, estabelecidos nos tecidos. A quinta edição da classificação de tumores do SNC da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicada em 2021 (CNS-5), incorpora inúmeros marcadores moleculares com utilidade clinicopatológica importantes para uma classificação mais precisa das neoplasias do SNC. Isso permite definir gliomas difusos adultos, oligodendroglioma mutado para o gene IDH (*lactic isocitrato desidrogenase*), com codeleção 1p/19q graus 2 a 3, astrocitoma mutado para IDH sem codeleção 1p/19q, graus 2 a 4 e wild- tipo glioblastoma (GBM) para IDH. A sobrevida mediana em pacientes com GBM é de apenas 14,6 meses, devido à resistência ao protocolo terapêutico mais utilizado no mundo, que envolve cirurgia, radioterapia e quimioterapia com temozolamida (TMZ), um potente alquilador genotóxico. Os critérios de seleção para o tratamento e estimativa do prognóstico em pacientes com essa doença são clínico-patológicos. Nos últimos anos, foram relatadas inúmeras alterações moleculares que ampliam o entendimento da biologia desses tumores, mas apenas algumas influenciam na decisão clínica e terapêutica como biomarcadores. Este artigo revisa as alterações moleculares relatadas para gliomas de alto grau no sangue periférico, destacando também a importância da padronização de novos biomarcadores juntamente com os achados histológicos para melhorar o conhecimento desses tumores.

Palavras-chave: diagnóstico; genética; glioma; previsão; sangue.

Dirección de
correspondencia:
Lina Marcela Barrera
Arenas. Correo electrónico:
marcela.barrera@udea.
edu.co

INTRODUCCIÓN

Los gliomas de alto grado son los tumores cerebrales primarios malignos más comunes en adultos, es usual que sean de curso rápido y fatal. La sobrevida media del glioblastoma (GBM), que es el más frecuente, es de 14.6 meses¹, esto se debe en especial a la carencia de un diagnóstico histopatológico acertado (hasta el 2016 la clasificación de la OMS, SNC-4, se basaba solo en la tinción con hematoxilina eosina e inmunohistoquímica) y a la resistencia al protocolo de terapia más utilizado, el cual fue publicado por Stupp, *et al*²⁻³ e involucra una resección quirúrgica lo más amplia posible, seguida de radioterapia y quimioterapia concomitante y adyuvante con temozolamida (TMZ). De ahí la necesidad de encontrar biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico. La búsqueda ha progresado para los gliomas de bajo grado⁴⁻⁶, pero ha sido poco fructífera en los de alto grado, de manera particular en los denominados en la SNC-4:

oligodendroglioma anaplásico (OA), astrocitoma anaplásico (AA, grado III) y el glioblastoma multiforme (GBM, grado IV)^{7,8}.

Estudios recientes genómicos sobre los gliomas de alto grado han ampliado el conocimiento de su biología y han proporcionado la oportunidad de encontrar nuevos biomarcadores^{6,9}. Cabe aclarar que algunos de los biomarcadores descubiertos son empleados para el diagnóstico, predecir el pronóstico y efectuar el monitoreo de la evolución del paciente a lo largo de los diferentes tratamientos, solo unos pocos marcadores influyen en la toma de decisiones clínicas como predictores de respuesta^{10,11}.

Por tanto, continuar con la búsqueda de biomarcadores es transcendental para mejorar el diagnóstico e incrementar la eficiencia en la selección de tratamientos para los gliomas de alto grado¹². Así, este artículo proporciona una perspectiva sobre la búsqueda de nuevos biomarcadores en sangre y la dirección que está tomando la investigación.

TEMA CENTRAL

Biomarcadores genéticos existentes para gliomas de alto grado

Hasta hace poco, solo tres biomarcadores genéticos-moleculares eran relevantes para la clasificación y terapia en gliomas: i) ante la duda de componente oligodendrogial se realiza la búsqueda de la codelección 1p/19q y el análisis de la expresión por inmunohistoquímica de la IDH, ya que la mutación de este gen, junto a la codelección, confirma que se trata de un oligodendroglioma; y ii) la metilación del promotor del gen de la metil guanina DNA metil transferasa (MGMT) indicaría una mayor susceptibilidad a la TMZ, ya que la enzima que revierte el efecto de este medicamento estaría ausente¹⁰.

En la actualidad, se recomienda buscar las mutaciones del promotor del gen *TERT* y de los genes *capicúa* que dan origen a una proteína represora transcripcional (*CIC*), de *FUBP1* que da origen a la proteína 1 de unión al elemento *upstream* Far, y *NOTCH1* que transcribe la proteína 1 homóloga de muesca del locus neurogénico. *Esto además ayuda a definir los oligodendrogliomas.*

La inactivación del gen *ATRX* (síndrome de déficit intelectual/alfa talasemia relacionado con el cromosoma X) que es mutuamente excluyente con la codelección 1p/19q, en asociación con las mutaciones del gen supresor *TP53*, *IDH*, y *CDKN2A/B*, se encuentra en los gliomas de bajo grado que viran a astrocitomas grado 3 y 4. Para el GBM (que se caracteriza por la ausencia de la mutación de *IDH*) se busca la amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico variante III (*EGFRvIII*), la activación de transcriptasa reversa de la telomerasa (*TERT*; ya sea por metilación del promotor del gen o mutación puntual)¹³⁻¹⁵, la monosomía del cromosoma 7 y la trisomía del 10.

Recientemente, se han adicionado biomarcadores a la lista: *H3F3A G34 R/V*, *BRAF V600E* y mutación de *SETD2* (en lesiones supratentoriales) y *H3F3A K27M*, *Hist 1H3B/C K27M*, mutación de *FGFR1*, amplificación de *PDGFRA*, mutación de *PI3K*, mutación de *ACVR1* y mutación o pérdida de *NF1* (en lesiones de línea media)⁸. Se encontró, además, que los genes centrales-*CCNB1*, *CDC6*, *KIF23* y *KIF20A* funcionan como biomarcadores para diagnosticar y tratar el GBM¹⁶.

Cabe anotar que la mayoría de esta información se puede obtener a través de la secuenciación de nueva generación (NSG), comercializada en varias plataformas¹⁷⁻¹⁸.

Nuevos biomarcadores moleculares para gliomas de alto grado

Dada la poca utilidad de los biomarcadores actuales para estudiar la sobrevida de los pacientes, se están ha-

ciendo esfuerzos para desarrollar marcadores dinámicos mínimamente invasivos, más sensibles y específicos, que midan el estado de la enfermedad, los cambios del tumor y que den una mejor respuesta a la terapia^{19,20}. Esto se justifica por la variabilidad individual observada en la respuesta terapéutica, la cual estaría dada en buena parte por alteraciones génicas. De hecho, en el área de la oncología molecular, está en auge la investigación genómica en pacientes catalogados como “respondedores excepcionales”, son un pequeño grupo de individuos que parecen tener una supervivencia más larga. Esto con miras a encontrar en ellos variaciones génicas y epigenéticas distintivas²¹⁻²³.

En gliomas de alto grado, los “respondedores excepcionales” presentan la hipermetilación del promotor del gen *MGMT*²⁴⁻²⁶. Nuevos estudios apuntan a que en este grupo hay otros factores genéticos pronósticos, los cuales pueden servir para reorientar la fármaco-oncología hacia drogas experimentales o medicamentos emergentes^{23,27}. Por otro lado, una variedad de métodos basados en RNA y DNA están siendo evaluados en la actualidad y se están estableciendo valores de corte, para incrementar la robustez de estos procedimientos en su uso clínico¹⁰.

Biomarcadores basados en sangre

Las biopsias líquidas son muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) o en sangre, las cuales son analizables con métodos cualitativos y cuantitativos bastante sensibles. En ellas se han detectado marcadores circulantes como ácidos nucleicos [DNA tumoral circulante (ctDNA), RNA, miRNA], proteínas, exosomas y células de tumor circulantes (CTC)²⁸. Su principal ventaja está en que se pueden realizar sin necesidad de repetir cirugías o biopsias²⁹. En comparación con otros tipos de tumores malignos, la transición a la práctica clínica se ha visto obstaculizada por las bajas tasas de detectabilidad, explicadas por la acción de la barrera hematoencefálica (BHE)^{20,30,31}. Se están llevando a cabo estudios para hacer más asequibles estos procedimientos en la práctica diaria³².

Existen tres tipos de biomarcadores en circulación: i) las CTC de diferentes regiones clonales, ii) moléculas solubles secretadas y iii) ácidos nucleicos libres de células (cf-NAS) que pueden transitar en el plasma o ser empaquetados en vesículas extracelulares (EV) con el propósito de ser protegidos de la degradación³³. No todas las regiones del tumor expulsan células y es probable que no se encuentren todos los perfiles genéticos³⁴. Por el contrario, todas las células producen EV y moléculas solubles libres como parte de su secretoma (conjunto de proteínas secretadas por una célula), incluso las células tumorales³⁵. Estas moléculas son expulsadas al flujo sanguíneo por los diferentes componentes celulares y de todas las regiones del tumor e informan sobre la neopla-

sia, pues la heterogeneidad genética del tumor da lugar a un espectro de células con diferentes capacidades de diferenciación y proliferación, así como perfiles únicos de expresión génica^{20,31,35}.

No está de más destacar que los biomarcadores sanguíneos de un glioma deben reflejar la biología del tumor, al igual que tener una vida media idónea, una dinámica en el tiempo y una técnica estandarizada de detección^{20,31,35}.

Tipos de biomarcadores en sangre

Células de tumor circulantes (CTC)

Las células tumorales circulan solas o por grupos en la sangre, como producto del desprendimiento desde el tumor primario o desde sitios metastásicos³⁵. Se estima que la concentración de CTC en sangre es de una $\times 10^5$ a 10^9 glóbulos blancos por mL, (1- 0 células/10 mL de sangre). Su vida media en la circulación es de 1-2.4 horas^{20,31}.

Las CTC se descubrieron hace poco en pacientes con glioma³⁵, con tasas de detección diversas y en menor cantidad en comparación con otros tipos de cáncer³⁵. Estas células permiten el análisis genético, pero no posibilitan observar la heterogeneidad de muchos tumores, pues no reflejan las diferentes clonas de la neoplasia. Si bien el número de estas células es reducido, representan un subconjunto de clonas que proporcionan información sobre la biología del tumor^{31,35}.

Estudios en cáncer de mama metastásico, de próstata y colorrectal han encontrado que los niveles de CTC son predictores independientes de supervivencia global y libre de progresión³⁶, lo que muestra la importancia de estas células como biomarcadores.

Existen varios métodos de detección, aislamiento y caracterización de las CTC, como la inmunotinción, la PCR en tiempo real (RT-PCR) o la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). También se emplea citometría de flujo que implica el uso de un marcador expresado de manera constante y exclusiva en las CTC y no en las células sanguíneas. Estudios más recientes han utilizado PCR digital o BEAMing (cuentas, emulsión, amplificación, magnetismo)^{20,31}. La optimización de estos ensayos es también un reto, ya que la muestra suele estar contaminada con leucocitos, por lo que debe perfeccionarse la sensibilidad del ensayo y así minimizar los falsos positivos³¹.

Se han reportado pocas investigaciones relacionadas con CTC en pacientes con gliomas de alto grado. Se ha usado la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) para identificar CTC de GBM y separarlas de los mononucleares de la sangre³⁵. En otro estudio, solo en el 20% de 141 pacientes con GBM se encontró una célula por muestra de 10 ml de sangre. En otra investigación que empleó

un nuevo ensayo de telomerasa, se detectaron CTC en ocho de 11 pacientes y las concentraciones celulares disminuyeron después de la radioterapia en cinco casos³⁷.

Existen evidencias indirectas de la presencia de CTC en pacientes con gliomas³⁸. Una es la aparición de GBM metastásico que se observa, rara vez, en la práctica clínica (0.4%-0.5%), lo cual indica que las células de esta clase de tumor se diseminan por vía sanguínea²⁰. Además, se han reportado al menos 17 casos de transmisión de GBM en pacientes que recibieron trasplantes de órganos de donantes con esta patología. Entre el 12.5% y el 25% de los donantes con GBM transmiten el tumor, esto evidencia que las células tumorales estaban presentes en otros órganos en el momento de la cirugía de trasplante³⁹.

Hasta la fecha ningún estudio ha evaluado la relación entre los niveles de CTC y los resultados en glioma, pero una investigación realizada en el 2014 encontró una asociación entre la amplificación de EGFR en el tumor primario con la detección de CTC, lo que sugiere que la señalización EGFR es parte del mecanismo por el cual las células del glioma se diseminan. También se ha descubierto que la mayoría de las CTC detectadas en pacientes con GBM tienen características con predominancias mesenquimales^{40,41}.

Proteínas circulantes asociadas al tumor

Las proteínas circulantes en suero se han utilizado como biomarcadores tumorales en diversos cánceres. Ejemplos destacados incluyen PSA en el cáncer de próstata, ACE en el colorrectal, CA19-9 en el pancreático y CA125 en cáncer de ovario. Se documentó la presencia de Her2 en cáncer de mama y BRAF en melanoma^{35,42}.

Hasta ahora, la búsqueda de proteínas como biomarcadores específicos de gliomas no ha tenido éxito, pues las proteínas que se han estudiado no son específicas. Sin embargo, las proteínas investigadas se clasifican en tres grupos: i) marcadores específicos gliales o neuronales, ii) proteínas proangiogénicas y iii) citoquinas inmunomoduladoras²⁰. Mediante la proteómica se han identificado varias proteínas de este tipo, son secretadas en pequeñas cantidades por las células tumorales³³.

Muchas de las proteínas circulantes más investigadas son proangiogénicas, debido al reciente interés en el tratamiento de estos tumores con antiangiogénicos. La más estudiada es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una proteína de 38.2 kDa que tiene como funciones la estimulación del crecimiento de las células endoteliales, la angiogénesis y el aumento de la permeabilidad capilar. La sobreexpresión de VEGF y su ligando son características comunes en GBM, por lo que se emplea el bevacizumab (Avastin) como tratamiento antiangiogénico⁴³.

Los niveles de VEGF en circulación se han analizado en diferentes estudios y no parecen estar asociados con la supervivencia global, ni con la recurrencia del GBM. Con esto se sugiere que es poco probable que el VEGF sea un marcador valioso^{20,44}.

El EGFR ha sido bastante investigado como parte de los aspectos moleculares de la enfermedad⁴⁵. No obstante, hasta hoy solo se ha realizado un estudio prospectivo como marcador de GBM⁴⁶, en el que se evidenciaron diferencias entre los niveles de EGFR en controles sanos y en los pacientes antes, durante y después de la cirugía. Los pacientes tenían mayores niveles séricos de EGFR en comparación a los controles. Sin embargo, los niveles de EGFR no disminuyeron de manera significativa en el postoperatorio, lo que apunta que no se trata de un marcador confiable en el seguimiento. Otro estudio demostró que la proteína mutante EGFRvIII, aunque no es representativa de todos los tumores, se puede detectar y emplear como vacuna peptídica, lo cual se está validando clínicamente^{10,15,35}.

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es otro marcador circulante que refleja el estado de la enfermedad y la supervivencia en pacientes con gliomas de alto grado. En algunos ensayos clínicos se ha evaluado el impacto pronóstico de los niveles de FGF circulante y se ha encontrado asociación entre su aumento en suero y un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad⁴⁷. En otro estudio prospectivo se sugirió que el aumento de FGF se correlaciona con la disminución de la supervivencia global^{20,44}. Por último, estudios previos de los tres biomarcadores ya explicados establecieron esas proteínas como marcadores predictivos de la respuesta a agentes antiangiogénicos, más no como biomarcadores de seguimiento de la enfermedad²⁰.

La tercera categoría de proteínas séricas probadas como marcadores tumorales del GBM son las citoquinas inmunomoduladoras. Se han realizado estudios con TGF- β y metaloproteinasa-9 (MMP-9), pero no se ha encontrado correlación con la supervivencia global o con el tamaño de la lesión. En otras investigaciones se han detectado moléculas con potencial pronóstico (CXCR4, S100A8 y S100A9), que no han sido validadas. Así mismo, es posible encontrar el oncometabolito 2 hidroxiglutarato (2-HG) en suero, pero no se ha correlacionado con la presencia de la mutación IDH1/2 o con el tamaño del tumor^{20,35,44}.

Se debe señalar que una limitación importante de las proteínas como biomarcadores de cáncer en sangre, en contraste con el ctDNA y las CTC, es su falta de especificidad²⁰. Además, en los pacientes se presentan alteraciones en la BHE que cambia su permeabilidad, lo que impide su propagación⁴⁸.

Vesículas extracelulares (EV)

Todas las células liberan EV, son capaces de generar comunicación intercelular a larga distancia como respuesta fisiológica o por enfermedad aguda o crónica. Las EV son unidades de información biológica que contienen cargas completas de moléculas, principalmente solubles, que circulan de manera libre en el plasma y son protegidas para evitar su degradación. En el caso de las células cancerosas, la liberación de EV podría ser la respuesta efectiva del tumor a los cambios fisiológicos, así se promueve un ambiente para la progresión y diseminación de la neoplasia mediante la alteración de la respuesta inmune, el aumento de la proliferación celular, la promoción de la angiogénesis, la remodelación de la matriz extracelular y, en última instancia, las metástasis^{35,49,50}.

Las EV son de tres tipos según su tamaño: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Los exosomas tienen 40 a 200 nm de diámetro y se generan en la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Las microvesículas surgen como un brote de la membrana citoplasmática y abarcan entre 50 y 1000 nm. La subcategoría más grande de EV son los cuerpos apoptóticos (50-5000 nm de diámetro) que se forman como un subproducto de la apoptosis^{31,42}.

La carga de las EV es empaquetada de forma selectiva y refleja el estado de la célula donadora, como una célula cancerosa desregulada, lo que la convertiría en reservorio óptimo para biomarcadores. Se conoce muy poco sobre la farmacodinámica de las EV. Tienen una media de vida corta debido a su papel en las funciones celulares y a que son eliminadas a través del bazo, el hígado u otros órganos^{31,35}.

Estas moléculas son detectables en plasma y suero, así como en fluidos, incluidos el LCR, la saliva y la orina; además, existen varios métodos de aislamiento de estas partículas. Como carecen de marcadores únicos, la mayoría de las técnicas se basan en propiedades físicas. El método más común es la centrifugación diferencial. También se emplean microscopía, citometría de flujo y separación por tamaño con ultrafiltración y cromatografía. Aun así, se necesita un mayor refinamiento de las técnicas para mejorar el rendimiento de este tipo de ensayos^{31,35,50}.

Se ha demostrado que los niveles de exosomas y microvesículas se correlacionan con el pronóstico en varios tipos de tumores, hasta con cánceres gástricos y ováricos³¹. En gliomas se conoce que las células tumorales liberan estas vesículas y existen estudios que muestran su potencial como biomarcadores⁵⁰.

Exosomas

Como ya se mencionó, los exosomas son el tipo de EV más pequeñas que emplea la célula como mecanismo de transferencia lateral, tanto de proteínas, mRNA o miRNA, como de oncogenes activos^{42,50}. Mientras que las microvesículas brotan desde la membrana citoplasmática, los exosomas se forman a partir de vesículas intraluminales que surgen en endosomas tempranos y luego ensamblan endosomas multivesiculares (MVE). Estos son liberados por fusión con lisosomas o con la membrana celular, o por liberación de la membrana citoplasmática, lo que resulta en la secreción de las vesículas en el espacio extracelular^{42,49,50}. La liberación de exosomas se da en células normales y en tumorales, en las que se genera un intercambio de información a través de vías químicas o señales eléctricas en el cuerpo humano¹².

Investigaciones recientes sugieren que la liberación de vesículas es potenciada por procesos oncogénicos⁵⁰ y que las células tumorales inducen o inhiben vías celulares y moleculares de las células receptoras. Esto las lleva a tener un crecimiento desordenado y al desarrollo de varios tipos de cáncer¹², de esa manera se demuestra que los exosomas y su carga tienen un papel clave en diferentes estadios de esta enfermedad.

Varios estudios muestran cómo estas estructuras y su carga contribuyen al crecimiento de gliomas de alto grado en diferentes estados⁵¹. Los exosomas liberados de las células tumorales son absorbidos por las células normales receptoras (endoteliales cerebrales) e internalizados por unas estructuras tipo endosoma y son capaces de estimular la formación de túbulos. Esto confirma que los exosomas sirven de medio para la comunicación intercelular, por lo tanto, son una herramienta crítica para que las células cancerosas influyan sobre las células normales vecinas^{31,49}.

También se conoce que los exosomas derivados de células tumorales son capaces de promover la proliferación de GBM, pues se han detectado mRNA y varios miRNAs exosomales en suero de pacientes^{12,49}. Otros estudios encontraron que los exosomas con miR-21 podrían ser biomarcadores diagnósticos para glioma⁵². Además, se descubrió que la vacunación de pacientes con GBM, utilizando miRNA exosomal que contenía IL-8, TGF- β , TIMP1, se correlaciona con una respuesta inmunológica positiva. También se evidenció que modulan el sistema inmune, pues al emplear moléculas de suero enriquecido con exosomas, se induce la expresión de CD163^{35,53}. Varias investigaciones han utilizado el DNA y los miRNA transportados en las EV como método diagnóstico para gliomas, lo que permitió identificar la metilación y las mutaciones específicas de las células parentales y los tumores originales⁵⁴.

En conclusión, los exosomas liberados de las células tumorales y sus cargas pueden ser biomarcadores de diagnóstico y pronóstico para el seguimiento de los pacientes con diferentes tipos de glioma de alto grado^{12,52}.

Ácidos nucleicos libres de células tumorales (CF-NAS)

Incluyen DNA circulante (ctDNA) y miRNAs que transitan en sangre, tanto en plasma como en suero. Se observan en altas concentraciones en pacientes con cáncer³⁰. Su liberación al torrente sanguíneo está relacionada con la apoptosis y la necrosis de las células cancerosas en el microambiente tumoral. Las células necróticas y apoptóticas suelen ser fagocitadas por los macrófagos u otras células captadoras que liberan el DNA digerido al entorno tisular^{35,55}.

Cerca del 3.3% del DNA tumoral pasa a la sangre de forma daria. La cantidad dependerá del estado y tamaño del tumor y está influenciada por la degradación, la filtración de la sangre y la circulación linfática. Algunas células tumorales que circulan en la sangre, y depósitos micrometastásicos en sitios distantes, como la médula ósea y el hígado, también contribuyen a la liberación de cfNAS⁵⁵.

Los análisis de DNA circulante permiten detectar tumores relacionados con alteraciones genéticas y epigenéticas, que son relevantes para el desarrollo del cáncer. En adición, se ha demostrado recientemente que los miRNA circulantes son potenciales biomarcadores en sangre para la detección de cáncer^{55,56}.

Una desventaja de los cfNA está en que sus niveles reflejan factores fisiológicos y procesos patológicos que no son específicos del tumor, ya que hay niveles elevados en pacientes con lesiones malignas, en comparación con sujetos sanos. Esos niveles también están aumentados en pacientes con lesiones benignas, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, trauma en tejidos y exposiciones ambientales^{55,56}.

Los ácidos nucleicos son eliminados de la sangre por el hígado y el riñón. Tienen una vida media variable en la circulación, va desde 15 minutos hasta varias horas. Sin embargo, independiente de su tamaño o configuración, los cfNA se eliminan de la circulación de manera rápida y eficiente⁵⁶.

Estas moléculas se pueden extraer empleando kits comerciales, pero están sujetas a degradación rápida en su forma libre. Es por lo que se pueden encontrar en EV que las protege de la degradación^{35,55}. Otras estrategias para su detección son el uso de amplicones y la supresión de errores digitales durante la secuenciación, que consiste en una estrategia en la que se elimina *in silico* los artefactos de la técnica de secuenciamiento, cuestión que las hace sensibles a la detección de cfNA⁵⁶.

Algunos estudios demostraron reducción en la cantidad de cfNA en respuesta a la terapia y aumento asociado con la recurrencia. Lo anterior sugiere que la cuantificación de cfNA sirve para el seguimiento del estado de la enfermedad. Sin embargo, su cuantificación como marcador de la enfermedad es limitada⁵⁶.

A continuación, se explicarán los dos tipos de cfNA encontrados en pacientes con cáncer.

DNA circulante (ctDNA): son fragmentos de 150-200 pb procedentes de células apoptóticas y fragmentos celulares. Son expulsados por células tumorales como un mecanismo activo de liberación de DNA, lo que puede resultar en una transformación maligna de células distantes³¹.

Como biomarcador, el ctDNA muestra varias características favorables. Su corta vida media (<1.5 horas) lo hace ideal para estudiar los cambios dinámicos en la homeostasis tumoral. Asimismo, el ctDNA y los perfiles genéticos de muestras de tejidos tumorales o biopsias metastásicas tienen igual capacidad de contener mutaciones y cambios en patrones mutacionales. Los ctDNA son mucho más abundantes que las CTC, se estima que el número de células malignas requeridas para producir un nivel detectable es de 50×10^6 , una cantidad mucho más pequeña que el promedio de células en un tumor visible por imagenología. La tasa de detección es mayor en enfermedad metastásica avanzada en comparación con enfermedad localizada^{31,35}.

Otras ventajas del ctDNA son su alta especificidad y que se basa en la localización de alteraciones que no están presentes en el DNA normal en niveles apreciables. Los métodos más utilizados para la detección de ctDNA son la PCR digital y la NGS, las cuales permiten valorar mutaciones puntuales, variaciones de número de copias y reordenamientos cromosómicos. Existen otros métodos basados en fluorescencia, como la tinción con PicoGreen y la espectrometría ultravioleta (UV), o PCR cuantitativa (SYBR Green y TaqMan)^{31,55}.

Para los gliomas la BHE no solo es obstáculo en términos de tratamiento, sino en la identificación de un biomarcador eficaz. En comparación con otros tumores avanzados, la frecuencia de detección de ctDNA para gliomas es <10% y aproximadamente 40% para el meduloblastoma. Es mucho más baja que la de la mayoría de las neoplasias malignas (colon, mama, pulmón, próstata, riñón o tiroides)^{31,56,57}.

Las alteraciones genéticas relevantes, como la metilación del promotor del gen *MGMT*, la codelección 1p/19q y la expresión de EGFRvIII, son detectables en el ctDNA de pacientes con gliomas de alto grado^{57,58}.

A pesar de lo anterior, se necesitan más exploraciones donde se realice la evaluación cuantitativa de cfNA en grandes cohortes de pacientes, con parámetros clínicos

bien definidos. Tales investigaciones serán cruciales para definir los cfDNA como biomarcadores de pronóstico.

Micro-RNA (miRNA): los miRNA son moléculas pequeñas de RNA no codificantes compuestas de 18-25 nucleótidos, que regulan diferentes procesos como la proliferación, el ciclo celular y la apoptosis. También controlan muchas funciones celulares, en algunos casos actúan como oncogenes o GST y son el principal componente de la comunicación intercelular. Además, inhiben la expresión génica de manera específica e impiden la traducción del mRNA o inducen su degradación^{27,35,49,59}.

La alteración de estos miRNA lleva a anomalías en la regulación de su transcripción, procesamiento y defectos en su localización y en la maquinaria que los sintetiza. De esa manera se provocan mutaciones, rearrreglos cromosómicos y alteraciones epigenéticas. Esta acumulación de daños celulares ocasiona una sobreexpresión de oncogenes o subregulación de GST y promueve la carcinogénesis^{49,60}. La mayoría de los perfiles de expresión de miRNA evaluados en tejidos tumorales muestran diferencias con respecto a los tejidos sanos. Además, los miRNA tienen características específicas de tejido, debido a que muchos exosomas de células metastásicas reflejan el perfil del miRNA del tejido de origen. Es por esta razón que se relacionan con el pronóstico (progresión) de la enfermedad³⁵.

Numerosos estudios indican que la expresión alterada de miRNA está involucrada en diferentes eventos patogénicos en glioma, pues tienen muchos blancos moleculares (PTEN, Mdm2, TSC1, POLD2, TGF β -RII, CTGF y CAMTA1)¹². El primer estudio de miRNA en pacientes con GBM encontró que al inhibir la expresión de miR-21 aumenta la apoptosis. Este miRNA se asocia de manera grado-específica con GBM y contribuye al fenotipo de malignidad e inhibe la apoptosis. Su sobreexpresión se asocia a otros cánceres (mama, vejiga, laringe, entre otros)⁵². Otras investigaciones encontraron que la alteración más común en GBM es la sobreexpresión de miRNA en comparación con tejido sano, por ejemplo: la de miR-10b, miR-222 y miR-93^{35,49,61}.

Diferentes investigaciones concluyen que miR-130a tiene una correlación positiva con respuesta a TMZ, independiente del estado de metilación del gen *MGMT*. Afirman, incluso, que la regulación positiva de miR-326 y miR-130a, así como la regulación negativa de miR-323, miR-329, miR-155, miR-328, miR-124, miR-137, miR-128, miR-296 y miR-210, implica mejor sobrevida en pacientes con GBM, con mayor supervivencia libre de progresión^{12,61}. Estos descubrimientos sugieren que los miRNA permiten identificar pacientes de alto riesgo de progresión temprana antes de la cirugía.

Algunos estudios demuestran que el gen *miR-34* es un posible GST y blanco de transcripción de p53, pues

disminuye la migración e invasión de las células tumorales. Además, miR-138 actúa como un onco-miRNA que favorece la supervivencia, se expresa en células madre de glioma (GSC) y puede servir como biomarcador pronóstico y blanco terapéutico. Asimismo, la regulación negativa de miR-181b y miR-181c se asocia a mejor respuesta clínica en pacientes con gliomas de alto grado^{12,13,61}. Por lo tanto, es necesario continuar en la búsqueda de nuevos perfiles de miRNA, específicos para GBM y útiles en la práctica clínica como marcadores para el diagnóstico y el pronóstico.

CONCLUSIONES

En oncología es cada vez más importante el desarrollo de biomarcadores útiles para mejorar el diagnóstico de la enfermedad, guiar la selección de tratamientos y realizar el seguimiento de los pacientes. Esta revisión sobre biomarcadores en sangre periférica para gliomas de alto grado recopila la información de cada una de las estrategias utilizadas para tal fin. Cada vez la lista de estos marcadores es más amplia debido, en gran medida, al aumento en el número de estudios que muestran la biología del tumor como herramienta para entender la relación

entre las mediciones biológicas y los resultados clínicos.

Los biomarcadores también juegan un papel crítico en el mejoramiento del desarrollo de fármacos, ya que posibilitan ampliar la gama de tratamientos para los tumores del SNC que presentan tasas de sobrevida tan bajas. Para ello se usa la profundización en la comprensión de la fisiología tumoral.

Hasta la actualidad las investigaciones sobre biomarcadores en tumores cerebrales no son totalmente extrapolables a la práctica clínica. Por lo tanto, se hace necesario generar nuevas opciones de marcadores tumorales, por ejemplo, los identificables en sangre o de biopsias líquidas, mucho más prácticos que los actuales, debido a que no requieren repetir cirugías o biopsias. La investigación de biomarcadores en gliomas de alto grado es retardada, dada 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.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987–96.
2. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase iii study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC Trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):459–66.
3. DeAngelis LM. Chemotherapy for brain tumors—a new beginning. *N Engl J Med*. 2005;352(10):1036–8.
4. Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, Schramm J, Schnell O, Seidel C, et al. Molecular markers in low-grade gliomas: Predictive or prognostic? *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4588–99.
5. Guan X, Vengoechea J, Zheng S, Sloan AE, Chen Y, Brat DJ, et al. Molecular subtypes of glioblastoma are relevant to lower grade glioma. *Plos One*. 2014;9(3):e91216.
6. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2481–98.
7. Cohen AL, Colman H. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat Res*. 2015;163:15–30.
8. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and tert promoter mutations in tumors. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2499–508.
9. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98–110.
10. Staedtke V, Dzaye OD, Holdhoff M. Actionable molecular biomarkers in primary brain tumors. *Trends Cancer*. 2016;2(7):338–49.
11. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro-Oncol*. 2021;23(8):1231–51.
12. Saadatpour L, Fadaei E, Fadaei S, Nassiri R, Mohammadi M, Mousavi SM, et al. Glioblastoma: Exosome and microRNA as novel diagnosis biomarkers. *Cancer Gene Ther*. 2016;23(12):415–8.
13. Mittal S, Pradhan S, Srivastava T. Recent advances in targeted therapy for glioblastoma. *Expert Rev Neurother*. 2015;15(8):935–46.

14. Marumoto T, Saya H. Molecular biology of glioma. In: Yamanaka R, editor. Glioma [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2012 [cited Aug 28 2021]. p. 2–11. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3146-6_1.
15. Alentorn A, Duran-Peña A, Pingle SC, Piccioni DE, Idbaih A, Kesari S. Molecular profiling of gliomas: Potential therapeutic implications. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015;15(8):955–62.
16. Cui K, Chen JH, Zou YF, Zhang SY, Wu B, Jing K, et al. Hub biomarkers for the diagnosis and treatment of glioblastoma based on microarray technology. *Technol Cancer Res Treat*. 2021; 20:1533033821990368.
17. Soomro SH, Ting LR, Qing YY, Ren M. Molecular biology of glioblastoma: classification and mutational locations. *J Pak Med Assoc*. 2017;67(9):1410–4.
18. Comba A, Faisal SM, Varela ML, Hollon T, Al-Holou WN, Umemura Y, et al. Uncovering spatiotemporal heterogeneity of high-grade gliomas: From disease biology to therapeutic implications. *Front Oncol*. 2021;11:703764.
19. Riddick G, Fine HA. Integration and analysis of genome-scale data from gliomas. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(8):439–50.
20. Holdhoff M, Yovino SG, Boadu O, Grossman SA. Blood-based biomarkers for malignant gliomas. *J Neurooncol*. 2013;113(3):345–52.
21. Mullard A. Learning from exceptional drug responders. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(6):401–2.
22. Sheridan C. Cancer centers zero in on exceptional responders. *Nat Biotechnol*. 2014;32(8):703–4.
23. Chang DK, Grimmond SM, Evans TRJ, Biankin AV. Mining the genomes of exceptional responders. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(5):291–2.
24. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*. 2007;130(10):2596–606.
25. Mellai M, Caldera V, Annovazi L, Chio A, Lanotte M, Cassoni P, et al. MGMT promoter hypermethylation in a series of 104 glioblastomas. *Cancer Genomics Proteomics*. 2009;6(4):219–28.
26. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert M, et al. Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res*. 2009;15(21):6683–93.
27. Manrique-Guzmán S. Biomarkers in high-grade gliomas: A systematic review. *Gac Med Mex*. 2016;152(1):87–93.
28. Theakstone AG, Brennan PM, Jenkinson MD, Mills SJ, Syed K, Rinaldi C, et al. Rapid spectroscopic liquid biopsy for the universal detection of brain tumours. *Cancers*. 2021;13(15):3851.
29. Müller J, Kulasinghe A, Hartel G, Leo P, Warkiani ME, Jeffree RL, et al. Isolation of circulating tumour cells in patients with glioblastoma using spiral microfluidic technology—A pilot study. *Front Oncol*. 2021;11:681130.
30. Wang Y, Springer S, Zhang M, McMahon KW, Kinde I, Dobbyn L, et al. Detection of tumor-derived dna in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(31):9704–9.
31. Wang J, Bettgowda C. Applications of dna-based liquid biopsy for central nervous system neoplasms. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):24–34.
32. Jelski W, Mroczko B. Molecular and circulating biomarkers of brain tumors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):7039.
33. Pienkowski T, Kowalczyk T, Kretowski A, Ciborowski M. A review of gliomas-related proteins. Characteristics of potential biomarkers. *Am J Cancer Res*. 2021;11(7):3425–44.
34. Sareen H, Garrett C, Lynch D, Powter B, Brungs D, Cooper A, et al. The role of liquid biopsies in detecting molecular tumor biomarkers in brain cancer patients. *Cancers*. 2020;12(7):1831.
35. Westphal M, Lamszus K. Circulating biomarkers for gliomas. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(10):556–66.
36. Zhang H, Yuan F, Qi Y, Liu B, Chen Q. Circulating tumor cells for glioma. *Front Oncol*. 2021;11:607150.
37. MacArthur KM, Kao GD, Chandrasekaran S, Alonso-Basanta M, Chapman C, Lustig RA, et al. Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Res*. 2014;74(8):2152–9.
38. Ali H, Harting R, de Vries R, Ali M, Wurdinger T, Best MG. Blood-based biomarkers for glioma in the context of gliomagenesis: A systematic review. *Front Oncol*. 2021;11:665235.
39. Armanios MY, Grossman SA, Yang SC, White B, Perry A, Burger PC, et al. Transmission of glioblastoma multiforme following bilateral lung transplantation from an affected donor: Case study and review of the literature. *Neuro-Oncol*. 2004;6(3):259–63.
40. Müller C, Holtschmidt J, Auer M, Heitzer E, Lamszus K, Schulte A, et al. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Sci Transl Med*. 2014;6(247):247ra101–247ra101.
41. Sullivan JP, Nahed BV, Madden MW, Oliveira SM, Springer S, Bhere D, et al. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discov*. 2014;4(11):1299–309.
42. Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles: Messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle*. 2009;8(13):2014–8.
43. El-khayat SM, Arafat WO. Therapeutic strategies of recurrent glioblastoma and its molecular pathways ‘lock up the beast.’ [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 30] disponible en: ecancermedicalscience.

44. Ilhan-Mutlu A, Wagner L, Widhalm G, Wöhrer A, Bartsch S, Czech T, et al. Exploratory investigation of eight circulating plasma markers in brain tumor patients. *Neurosurg Rev.* 2013;36(1):45–56.
45. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev.* 2012;26(8):756–84.
46. Quaranta M, Divella R, Daniele A, Di Tardo S, Venneri MT, Lolli I, et al. Epidermal growth factor receptor serum levels and prognostic value in malignant gliomas. *Tumori.* 2007;93(3):275–80.
47. Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Gerstner E, et al. Phase ii study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2010;28(17):2817–23.
48. Zheng X, Tang Q, Ren L, Liu J, Li W, Fu W, et al. A narrative review of research progress on drug therapies for glioblastoma multiforme. *Ann Transl Med.* 2021;9(11):943–943.
49. Shea A, Harish V, Afzal Z, Chijioke J, Kedir H, Dusmatova S, et al. MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. *Cancer Med.* 2016;5(8):1917–46.
50. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (Ev): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013;113(1):1–11.
51. Wang H, Jiang D, Li W, Xiang X, Zhao J, Yu B, et al. Evaluation of serum extracellular vesicles as noninvasive diagnostic markers of glioma. *Theranostics.* 2019;9(18):5347–58.
52. Cho WCS. MicroRNAs: Potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(8):1273–81.
53. Muller L, Muller-Haegeler S, Mitsuhashi M, Gooding W, Okada H, Whiteside TL. Exosomes isolated from plasma of glioma patients enrolled in a vaccination trial reflect antitumor immune activity and might predict survival. *Oncol Immunology.* 2015;4(6):e1008347.
54. Maire CL, Fuh MM, Kaulich K, Fita KD, Stevic I, Heiland DH, et al. Genome-wide methylation profiling of glioblastoma cell-derived extracellular vesicle dna allows tumor classification. *Neuro Oncol.* 2021;23(7):1087–1099.
55. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-Free Nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(6):426–37.
56. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, et al. Fragment length of circulating tumor DNA. *Plos Genet.* 2016;12(7):e1006162.
57. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor dna in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra24–224ra24.
58. Salkeni MA, Zarzour A, Ansay TY, McPherson CM, Warnick RE, Rixe O, et al. Detection of egfrviii mutant dna in the peripheral blood of brain tumor patients. *J Neurooncol.* 2013;115(1):27–35.
59. Vella MC. The C. Elegans microRNA Let-7 binds to imperfect Let-7 complementary sites from the Lin-41 3'utr. *Genes Dev.* 2004;18(2):132–7.
60. Henriksen M, Johnsen KB, Andersen HH, Pilgaard L, Duroux M. MicroRNA expression signatures determine prognosis and survival in glioblastoma multiforme—A systematic overview. *Mol Neurobiol.* 2014;50(3):896–913.
61. Møller HG, Rasmussen AP, Andersen HH, Johnsen KB, Henriksen M, Duroux M. A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: Micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Mol Neurobiol.* 2013;47(1):131–44.