

**Universidad CEU San Pablo
CEINDO – CEU Escuela Internacional de
Doctorado**

PROGRAMA en MEDICINA TRASLACIONAL

**DETECCIÓN DE MARCADORES
MOLECULARES MEDIANTE BIOPSIA
LÍQUIDA EN TUMORES
CEREBRALES PEDIÁTRICOS Y DEL
ADOLESCENTE**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
María del Pilar Areal Hidalgo

Dirigida por:
**Ángel Ayuso Sacido
Blanca López-Ibor Aliño**



CEU

*Escuela Internacional
de Doctorado*

Madrid, Marzo 2021

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, Ángel Ayuso Sacido y Blanca López-Ibor Aliño.

A Blanca por haberme animado a emprender la elaboración de esta tesis, confiar en mí y haberme dado la gran oportunidad de aprender a su lado, transmitirme su entrega y dedicación en el cuidado de los pacientes y prestarme su ayuda profesional y personal, en todo momento.

A Ángel por haberme guiado en todo el proceso investigador, por su gran profesionalidad y perseverancia, enorme paciencia y actitud positiva.

Gracias al equipo del laboratorio de Neuro-Oncología de la Fundación de Investigación HM (FiHM) Hospitales, especialmente a Noemí y a Pepa, por su tiempo, dedicación y enseñanzas. Este proyecto no habría podido llevarse a cabo sin su trabajo. Y a la propia FiHM, por haberme ayudado en la realización de mis estudios de Doctorado.

Gracias a todo el equipo de de la Unidad de Oncología Pediátrica del Hospital Universitario HM Montepríncipe y a los profesionales de los demás hospitales colaboradores.

Gracias a todos los niños y sus familias.

Gracias a mis padres, por haberme inculcado desde pequeña el valor del estudio y esfuerzo.

Gracias a todas las personas que me han apoyado durante este camino. A Carmen y a Atilano. A mis amigos, en especial a Ana y a Rosa.

Y por último, gracias infinitas a Mel y a nuestra pequeña Julia, por quererme tanto y darme la fuerza que muchas veces me ha faltado.

La herramienta para poder acceder a lo más profundo del ser humano,
además de la PCR digital,
es el amor.

Para ti, mamá.

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
1. Inicios y evolución en el estudio del cáncer	1
2. Tumores cerebrales	5
2.1. Conceptos generales y clasificación de los tumores cerebrales	5
2.2. Tumores cerebrales en la edad pediátrica	8
2.2.1. Epidemiología de los tumores cerebrales infantiles	8
2.2.2. Etiopatogenia de los tumores cerebrales infantiles	9
2.2.3. Clasificación de los tumores cerebrales infantiles	10
2.2.4. Pronóstico y tratamiento de los tumores cerebrales infantiles	13
2.2.5. Alteraciones moleculares en los tumores cerebrales infantiles	14
3. Acceso a la información histopatológica y molecular del tumor: la biopsia	27
3.1. La biopsia sólida	27
3.2. La biopsia líquida	29
EXPERIENCIA PREVIA E HIPÓTESIS DE TRABAJO	41
OBJETIVOS	44
1. Objetivo general	44
2. Objetivos específicos	44
MATERIALES Y MÉTODOS	46
1. Diseño de estudio	46
2. Aprobación del estudio	47
3. Selección de pacientes y obtención del consentimiento informado	47
4. Obtención y recogida de las muestras	48
5. Envío de muestras y conservación	51
6. Procesamiento de muestras	52
6.1. Obtención del plasma y capa leucocitaria	52
6.2. Separación del suero	53
6.3. Procesamiento del líquido cefalorraquídeo	53
7. Aislamiento y cuantificación del ADN circulante	54
7.1. Aislamiento del ADN circulante	54
7.2. Cuantificación del ADN circulante	57
8. Obtención del ADN de línea germinal	58
9. PCR digital	59

10. PCR convencional	60
11. Secuenciación	61
12. Cálculos estadísticos	61
13. Creación de la base de datos	63
RESULTADOS	64
1. Descripción de la muestra	64
1.1. Cohorte inicial:	64
1.2. Cohorte definitiva a estudio:	66
2. Validación de técnicas de aislamiento de ADN circulante a partir de las muestras de biopsia líquida	71
3. Aislamiento de ADN circulante en las muestras de biopsia líquida	72
4. Desarrollo de técnicas de detección molecular	75
4.1. Pruebas de validación de sondas para BRAFV600E y H3K27M para dPCR en tejido sólido	76
4.2. Pruebas de determinación de sensibilidad de la dPCR para la detección de la mutación V600E de BRAF en biopsia líquida	80
5. Evaluación de la posibilidad de detectar mutaciones en el ADN circulante aislado en suero, plasma y LCR de pacientes pediátricos y adolescentes diagnosticados de tumores cerebrales de difícil acceso	83
5.1. Estado mutacional del tumor en muestras sólidas	83
5.2. Evaluación de la mutación BRAFV600E en línea germinal	85
5.3. Evaluación de la mutación BRAFV600E en diferentes fuentes de biopsia líquida	87
5.4. Concordancia del estado mutacional de BRAF en tumor sólido y en biopsia líquida	89
5.5. Respuesta al tratamiento dirigido de un paciente diagnosticado de ganglioglioma con mutación V600E de BRAF	91
DISCUSIÓN	93
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	111

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia en España por grupos diagnósticos de cáncer infantil.....	9
Figura 2. Distribución en frecuencia de los diferentes subtipos de tumores cerebrales infantiles y del adolescente (edad 0-19 años).....	12
Figura 3. Distribución en frecuencia de los tumores cerebrales del adulto.	12
Figura 4. Descripción esquemática de la vía de señalización MAPK.....	19
Figura 5. Representación esquemática de la fusión del gen KIAA1549-BRAF.	20
Figura 6. Cromatogramas de secuencia mutante y de tipo salvaje del exón 15 de BRAF	21
Figura 7. Cromatogramas de secuenciación de H3.	24
Figura 8. Representación de las localizaciones preferentes de las mutaciones de H3 en los gliomas de alto grado.	25
Figura 9. Material genético circulante disponible para análisis mediante biopsia líquida.	32
Figura 10. Aplicaciones y ventajas de la biopsia líquida.	34
Figura 11. Esquema de la secuencia de la técnica de PCR digital.	40
Figura 12. Tubos de recolección de muestras.	49
Figura 13. Representación general del origen y distribución del material presente en los biofluidos analizados y los métodos de extracción utilizados en nuestro estudio.	50
Figura 14. Esquema del flujo de las muestras biológicas.	51
Figura 15. Esquema de gradiente de densidad con Ficoll-Paque.....	53
Figura 16. Esquema de procedimiento de aislamiento de ADN circulante.	55
Figura 17. Ecuación de Excel para calcular el p-valor según distribución de Poisson.....	62
Figura 18. Distribución en frecuencia de tipos tumorales de muestra inicial (N=38).....	65

Figura 19. Distribución de los tipos tumorales en la muestra definitiva a estudio.	69
Figura 20. Distribución de los tumores en cuanto a localización anatómica.	69
Figura 21: Distribución de los pacientes por rangos de edades.	70
Figura 22 Distribución de los pacientes por sexo.....	70
Figura 23. Detección mediante dPCR de la mutación BRAFV600E comparando dos métodos de extracción de ADN circulante (F:Cl:I y Kit de Qiagen) y diferentes volúmenes de muestra de plasma de partida.	72
Figura 24. Flujo de trabajo realizado en el desarrollo de técnicas de detección molecular	75
Figura 25. Validación de la sonda para la mutación V600E de <i>BRAF</i> por dPCR en tejido sólido.	76
Figura 26. Validación de la sonda para la mutación K27M de <i>H3F3</i> por dPCR en tejido sólido. Réplica 1.	77
Figura 27. Validación de la sonda para la mutación K27M de <i>H3F3</i> por dPCR en tejido sólido. Réplica 2.	77
Figura 28. dPCR para la mutación K27M de <i>H3F3</i> en mezcla de tejidos con y sin mutación, con ratio WT:Mut 50:50.....	78
Figura 29. dPCR para la mutación K27M de <i>H3F3</i> en mezclas de tejidos con y sin mutación, con ratio WT:Mut 90:10.....	79
Figura 30. dPCR para la mutación K27M de <i>H3F3</i> en mezclas de tejidos con y sin mutación, con ratio WT:Mut 99:1.....	79
Figura 31. dPCR para la mutación K27M del gen <i>HIST1H3B</i> por dPCR.	80
Figura 32. Detección de la mutación V600E de <i>BRAF</i> mediante dPCR en diluciones progresivas de controles mutados.	81
Figura 33. Comatogramas de secuencias de BRAF obtenidas de línea germinal.	86
Figura 34. Imágenes de RM del paciente LI.31 antes y durante el tratamiento con dabrafenib.	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de las clasificaciones de la OMS 2007 y 2016.....	6
Tabla 2: Principales alteraciones genéticas y entidades descritas en tumores cerebrales infantiles	16
Tabla 3. Pruebas diagnósticas basadas en biopsia líquida aprobadas por la FDA.....	35
Tabla 4. Cohorte de pacientes con sus características clínicas.....	66
Tabla 5. Total de muestras obtenidas de cada paciente y extracción de ADN circulante realizada en cada una de ellas (N=38).....	73
Tabla 6. Descripción de las características clínicas de los pacientes pediátricos a estudio con tumores del SNC y fuente de biopsia líquida obtenida en cada uno de ellos. Análisis de BRAF por PCR en línea germinal.	82
Tabla 7. Descripción de disponibilidad de tejido tumoral y análisis de la mutación BRAF V600E en biopsia sólida en la cohorte de pacientes a estudio (N=29).	84
Tabla 8. Datos de la extracción de ADN a partir de las muestras de buffy coat.	85
Tabla 9. Analisis de BRAF V600E en ctADN aislado en suero, plasma, LCR por dPCR y en tumor original por PCR convencional.	88
Tabla 10. Concordancia entre biopsia sólida y biopsia líquida (N=13).	90

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico
- ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase
- ALT: Alargamiento alternativo de telómeros
- Amp: Amplificación
- ATRT: Tumor teratoide/rabdoide atípico
- ATRX: Alfa-talasemia/síndrome de retraso mental ligado al cromosoma X
- AVCR1: Activin A Receptor Type 1
- BHE: Barrera hematoencefálica
- BRAF: V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
- CA-125: Carcinoma 125
- CEA: Antígeno carcinoembrionario
- COG: *Children Oncology Group*
- Cr: Cromosoma
- CSC: Cancer Stem Cell
- ctDNA: ADN circulante tumoral
- ctARN: ARN circulante tumoral
- DAXX: Death Domain Associated Protein 6*
- Del: Delección
- DIPG: Glioma pontino intrínseco difuso
- dPCR: PCR digital
- ddPCR: Droplet Digital PCR*
- Dup: Duplicación
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
- EMA: Agencia Europea de Medicamentos
- EPN: Ependimoma
- ERK: Quinasa reguladora de señal extracelular
- Evs: Vesículas extracelulares

EWSR1: *Ewing Sarcoma RNA Binding Protein 1*
 F:Cl:I: Fenol:Cloroformo:Isoamilalcohol
 FDA: *The Food and Drug Administration*
 FGFR1: Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos
 FN: Falsos negativos
 FP: Falsos positivos
 FPEE: Fijación con formalina e inclusión en parafina
 Fus: Fusión
 FW: Forward
 HDAC: Inhibidores de histona desacetilasa
 HRAS: *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*
 HGG: Gliomas de alto grado
 ICGC: *The International Cancer Genome Consortium*
 ID: Identificación paciente
 IDH: Isocitrato deshidrogenasa
 LCR: Líquido cefalorraquídeo
 LGG: Gliomas de bajo grado
 MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
 mARN: ARN mensajero
 Min: Minutos
 Mut: Mutado
 NCI: Instituto Nacional del Cáncer
 NGS: Secuenciación de nueva generación
 NSCLC: Cáncer de pulmón no microcítico
 NOS: *Not otherwise specified*
 OMS: Organización Mundial de la Salud
 PA: Astrocitoma pilocítico
 PARP: Poli-ADP ribosa
 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
 PNET: Tumor neuroectodérmico primitivo
 PMA: Astrocitoma pilomixoide
 PSA: Antígeno prostático específico

PXA: Xantoastrocitoma pleomórfico
qPCR: PCR a tiempo real
RANO: *Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group.*
Reord: Reordenamiento
RM: Resonancia magnética
RV: *Reverse*
Seg: Segundos
SEGA: Astrocitomas subependimarios de células gigantes
SEHOP: Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica
SHH: *Sonic Hedgehog*
SIOP: *International Society of Paediatric Oncology*
SNC: Sistema nervioso central
Sobreexp: Sobreexpresado
TCGA: *The Cancer Genome Atlas*
TCT: Células Tumorales Circulantes
TYR: Tirosinasa
VPP: Valor predictivo positivo
VPN: Valor predictivo negativo
WNT: Wingless
WT: Wildtype

SUMMARY

Pediatric Central Nervous System (CNS) tumors are the most frequent solid neoplasms and the main cause of cancer mortality in pediatric ages.

Due to their localization and infiltrative nature, some tumor resections or biopsies are not feasible and they could carry great morbidity. In those cases, the use of minimally invasive methods as diagnostic, molecular marker detection, prognostic or monitoring therapies are emerging.

The analysis of liquid biopsies which contain genetic information from the tumor has been much more widely explored in adults than in children.

In this doctoral thesis, the detection of the BRAF V600E targetable mutation by digital PCR from circulating DNA (ctDNA) of a cohort of 29 pediatric patients with brain tumors was compared in three different sources of liquid biopsy: serum, plasma and cerebrospinal fluid (CSF).

Here we demonstrate that ctDNA isolated from serum and plasma could be successfully analyzed to obtain tumor genetic information which could be used to guide critical treatment decisions.

RESUMEN

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) son la principal neoplasia sólida y la causa más frecuente de mortalidad por cáncer en la edad pediátrica. Debido a su localización y naturaleza infiltrativa, algunas resecciones o biopsias tumorales no resultan factibles o acarrear especial morbilidad. En estos casos, el desarrollo de técnicas mínimamente invasivas que permitan obtener información derivada del tumor, útil en el proceso diagnóstico, pronóstico, terapéutico y de seguimiento a largo plazo, cobran especial relevancia.

La innovadora técnica denominada biopsia líquida, mediante la cual se pretende analizar material genético derivado de las células tumorales aislado en fluidos biológicos, se encuentra en pleno desarrollo, siendo éste mucho más amplio en adultos que en niños.

En la presente tesis doctoral, se ha comparado la detección de la mutación diana V600E del gen *BRAF* mediante PCR digital en ADN circulante obtenido de una cohorte de 29 pacientes pediátricos con tumores cerebrales, en tres fuentes diferentes de biopsia líquida: suero, plasma y líquido cefalorraquídeo.

Se demuestra que el ADN circulante aislado a partir de suero y plasma, podría analizarse con éxito para obtener información sobre la genética tumoral, la cual guiaría el manejo clínico de estos pacientes.

INTRODUCCIÓN

Existe en la actualidad un amplio consenso de que el cáncer es, en esencia, una enfermedad genética¹, en la cual la acumulación de alteraciones moleculares en el genoma de las células somáticas es la base del origen y progresión de las células cancerosas.

El desarrollo tanto de la anatomía patológica, con el estudio directo de los órganos afectados por diferentes patologías, como de la biología molecular, han sido determinantes a través de la historia de la medicina para poder alcanzar este grado de conocimiento en el campo de la oncología, y que hoy en día, continúa en crecimiento exponencial.

1. Inicios y evolución en el estudio del cáncer

Antonio **Benivieri** (1443-1502) es considerado el padre de la **anatomía patológica**, que surge como ciencia en 1507 tras la publicación del tratado "*De abditis nonnullis ac mirandis morborum et sanationum causis*" ("De algunas causas oscuras y admirables de enfermedades y curaciones"), basado en los metódicos apuntes de las autopsias realizadas por este reconocido médico humanista italiano, con consentimiento previo de los familiares².

Estas primeras autopsias realizadas en la etapa del Renacimiento son la base de la **ciencia moderna, experimental y objetiva**, que se aleja de los dogmas vigentes desde tiempos hipocráticos y de las restricciones impuestas en la Edad Media, permitiendo el avance revolucionario de la medicina³.

Las primeras observaciones en cadáveres, inicialmente de carácter superficial, fueron derivando en estudios más complejos que comenzaban a

relacionar la morfología y sus alteraciones como base fundamental en el entendimiento de las enfermedades y sus síntomas, tal y como se refleja en los trabajos de **Vesalio**, iniciador de la anatomía organicista, **Morgagni**, que sentó las bases del método anatomoclínico, constituyendo así el punto de partida de la anatomía patológica moderna, o **Bichat**, anatomista y fisiólogo francés, el cual introdujo el concepto de los **tejidos**⁴.

En el siglo XIX, con el desarrollo del microscopio óptico, se expande la **teoría celular**, teniendo como máximo exponente la obra de Rudolph **Virchow** en 1858, el cual enfatiza que las enfermedades surgen de forma primaria en las células individuales, no en los órganos o tejidos en general, lo cual condujo rápidamente a la concepción de la **biopsia** como elemento definitorio del diagnóstico médico⁵.

Esta teoría basada en la célula como unidad elemental, se traslada necesariamente al estudio de los **tumores**. Virchow mostró gran interés en esta patología, y aportó el primer criterio útil para clasificar los tumores cerebrales al describir la neuroglia, introduciendo el término “**glioma**” para distinguir las neoplasias provenientes de este tejido intersticial no neuronal, de otros tipos de tumores⁶.

Analizando la evolución desde ese primer acercamiento de ordenación de los tumores cerebrales, hace ya un siglo y medio, basada en las características microscópicas de las diferentes células, a la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2016, que incluye por primera vez criterios moleculares^{7,8}, se pone de manifiesto el gran avance en el conocimiento del origen y la biología del cáncer.

El cáncer es considerado en la actualidad, en esencia, una enfermedad genética. Como consecuencia de su inestabilidad y diversidad genómica, **las células tumorales van adquiriendo múltiples capacidades biológicas que las transforman progresivamente en células cancerígenas**. En el año 2000, Hanahan y Weinberg, realizan en “**The**

Hallmarks of Cancer” una extraordinaria estructuración de esta compleja maquinaria oncogénica, describiendo las siguientes seis capacidades adquiridas por la célula tumoral: señal de proliferación sostenida, evasión de los supresores de crecimiento, inmortalidad, invasión y metástasis, inducción de la angiogénesis y mecanismos de resistencia a la muerte celular⁹.

Una década más tarde en ***“Hallmarks of Cancer: The Next Generation”***, incorporan dos capacidades biológicas más: la evasión de la destrucción mediada por el sistema inmune y la reprogramación del metabolismo celular¹⁰, reflejo del creciente conocimiento de la biología tumoral

Como hemos referido, el origen de estas capacidades deriva de las diferentes aberraciones genéticas que van adquiriendo las células neoplásicas. El primer **oncogén** humano (*H-RAS*), es aislado y clonado por el equipo dirigido por Mariano **Barbacid** en 1982¹¹, hecho que sentó las bases del inicio de la **oncología molecular**, habiéndose descrito 3 años más tarde hasta 15 oncogenes diferentes¹.

La capacidad de secuenciar el genoma mediante el desarrollo de técnicas de **NGS** (secuenciación de nueva generación), ha contribuido de forma decisiva en las últimas dos décadas al conocimiento del avance y progresión de las células cancerosas, y con ello, a la transformación de la visión global de esta enfermedad, repercutiendo tanto en el diagnóstico como en la terapéutica.

El **proyecto del genoma humano**, completado en 2003, marcó el inicio de una nueva era en las ciencias biomédicas y por tanto en la oncología¹².

El poder disponer tanto del mapa de la secuencia genómica normal como de la descripción de variaciones (o polimorfismos) más comunes presentes en la especie humana (el denominado *HapMap*)¹³, asociado a la información obtenida de la secuenciación de familias de genes candidatos a ser esenciales en la génesis del cáncer, ha permitido el desarrollo del análisis sistemático de las alteraciones subyacentes en el origen y evolución de los diferentes tipos de tumores¹.

Mediante el desarrollo de la NGS y de las aplicaciones informáticas de procesamiento de datos a gran escala, se han secuenciado hasta ahora más de 50.000 genomas tumorales en todo el mundo, incluyéndose dicha información en “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA)¹⁴ y en “*The International Cancer Genome Consortium*” (ICGC)¹⁵, siendo esperable que esta cifra crezca exponencialmente en la próxima década¹⁶.

Los **tumores infantiles**, generalmente referidos a la población menor de 15 años, además de ser una patología con una baja incidencia, representando entre el 0.5% y 4.6% del número total de casos de cáncer a nivel mundial¹⁷, comprenden un grupo extensamente heterogéneo y difieren radicalmente de los que se presentan en la edad adulta.

A pesar de estas dificultades, también se han desarrollado diversos proyectos de secuenciación de tumores infantiles, realizándose la primera revisión de la información obtenida hasta el momento en la “*National Cancer Institute (NCI) Childhood Cancer Genomics Gaps and Opportunities Workshop*”, en el año 2015. Posteriormente, se han continuado realizando otros proyectos colaborativos a este respecto¹⁸.

Del análisis de la información obtenida hasta el momento, se puede destacar que los tumores infantiles pediátricos albergan muchas menos mutaciones puntuales de sustitución de aminoácidos por megabase (millón de nucleótidos) de ADN, y que los mecanismos subyacentes en la oncogénesis son, predominantemente, las alteraciones cromosómicas segmentarias, las fusiones y las mutaciones en genes que controlan el epigenoma¹⁹.

2. Tumores cerebrales

2.1. Conceptos generales y clasificación de los tumores cerebrales

Los tumores cerebrales comprenden un **grupo muy heterogéneo** de neoplasias, que se desarrollan a partir de las células que asientan en el sistema nervioso central (SNC).

El **tratamiento** clásico de los tumores del SNC es **multimodal**, basado clásicamente en tres pilares: cirugía, radioterapia y quimioterapia²⁰.

La evolución clínica y, por tanto, el **pronóstico varía enormemente**, desde cánceres altamente malignos, con una mediana de supervivencia de menos de un año, a pesar de tratamientos intensivos, hasta tumores indolentes que se curan exclusivamente con la resección quirúrgica.

Esta **heterogeneidad** se refleja en las diferentes **clasificaciones** histológicas que han coexistido en el último siglo, basadas principalmente en la célula de origen del tumor, sistema desarrollado por **Baley y Cushing**²¹.

La experiencia ha demostrado que los diagnósticos basados en **clasificaciones fundamentadas únicamente en la histología son claramente insuficientes** en la determinación de la naturaleza específica de cada tumor, y además, altamente subjetivas, con grandes variaciones interobservador, por lo que ofrecen una limitada utilidad para la toma de decisiones clínicas por parte de los médicos implicado en su manejo^{22,23}.

Gracias a la labor de la OMS de crear una clasificación común, el consenso entre los neuropatólogos ha mejorado considerablemente. La primera propuesta realizada en 2007, se basaba exclusivamente en hallazgos histopatológicos, pero como hemos referido previamente, debido al incremento de alteraciones genéticas descritas en los tumores del SNC, **se han incorporado por primera vez criterios moleculares** en la **nueva clasificación de 2016**. Esta clasificación ofrece una aproximación mucho

más actualizada y completa, que fija las bases para las próximas ediciones^{8,24}.

En la **tabla 1** (A, B y C) se indican las diferencias más significativas entre la clasificación de la OMS de 2016 y la previa del año 2007, las cuales afectan principalmente a los tumores astrocitarios (gliomas), meduloblastomas y tumores ependimarios²⁵.

Tabla 1. Comparación de las clasificaciones de la OMS 2007 y 2016.

A. Astrocitomas y tumores oligodendrogiales

CLASIFICACIÓN OMS 2007

Tumores astrocitarios	Grado
Astrocitoma pilocítico	I
Astrocitoma pilomixóide	II
Astrocitoma subependimario de células gigantes	I
Xantastrocitoma pleomórfico	II
Astrocitoma difuso	II
Variantes: Astrocitoma fibrilar*	II
Astrocitoma gemistocítico	II
Astrocitoma protoplasmático*	II
Astrocitoma anaplásico	III
Glioblastoma	IV
Variantes: Glioblastoma de cél gigantes	IV
Gliosarcoma	IV
Gliomatosis cerebrii*	III

Tumores Oligoastrocíticos	Grado
Oligoastrocitoma	II
Oligoastrocitoma anaplásico	III

Tumores Oligodendrogiales	Grado
Oligodendroglioma	II
Oligodendroglioma anaplásico	III

CLASIFICACIÓN OMS 2016

Astrocitomas difusos y tumores oligodendrogiales	Grado
Astrocitoma difuso, <i>IDH</i> -mutado	II
Astrocitoma gemistocítico, <i>IDH</i> -mutado	II
Astrocitoma difuso, <i>IDH</i> -wild type	II
Astrocitoma difuso, NOS	III
Astrocitoma anaplásico, <i>IDH</i> -mutado	III
Astrocitoma anaplásico, <i>IDH</i> -wild type	III
Astrocitoma anaplásico, NOS	III
Glioblastoma, <i>IDH</i> -wild type	IV
Variantes: Glioblastoma de cél gigantes	IV
Gliosarcoma	IV
Glioblastoma epiteloide*	IV
Glioblastoma, <i>IDH</i> -wild type	IV
Glioblastoma, NOS	IV
Glioma difuso de la línea media, H3K27M*	IV
Oligodendroglioma, <i>IDH</i> -mutado y 1p/19q codeleciónado	II
Oligodendroglioma, NOS	II
Oligodendroglioma anaplásico, <i>IDH</i> -mutado y 1p/19q codeleciónado	III
Oligodendroglioma anaplásico, NOS	III
Oligoastrocitoma, NOS	III
Oligoastrocitoma anaplásico, NOS	III

Otros tumores astrocíticos	Grado
Astrocitoma pilocítico	I
Astrocitoma pilomixóide	II
Astrocitoma subependimario de células gigantes	I
Xantastrocitoma pleomórfico	II
Xantastrocitoma pleomórfico anaplásico*	III

B. Meduloblastomas

CLASIFICACIÓN OMS 2007

Meduloblastoma	Grado
Meduloblastoma clásico	IV
Meduloblastoma desmoplásico/nodular	IV
Meduloblastoma con extensa nodularidad	IV
Meduloblastoma anaplásico/células grandes	IV

CLASIFICACIÓN OMS 2016

Meduloblastoma genéticamente definido	Grado
Meduloblastoma, WNT-activado	IV
Meduloblastoma, SHH-activado y TP53 mut	IV
Meduloblastoma, SHH-activado y TP-53 WT	IV
Meduloblastoma, no WNT/no SHH	IV
Meduloblastoma, grupo 3	IV
Meduloblastoma, grupo 4	IV
Meduloblastoma histológicamente definido	Grado
Meduloblastoma clásico	IV
Meduloblastoma desmoplásico/nodular	IV
Meduloblastoma con extensa nodularidad	IV
Meduloblastoma anaplásico/células grandes	IV

C. Ependimomas

CLASIFICACIÓN OMS 2007

Tumores ependimarios	Grado
Subependimoma	I
Ependimoma mixopapilar	I
Ependimoma	II
Ependimoma celular*	II
Ependimoma papilar	II
Ependimoma de células claras	II
Ependimoma tancítico	II
Ependimoma anaplásico	III

CLASIFICACIÓN OMS 2016

Tumores ependimarios	Grado
Subependimoma	I
Ependimoma mixopapilar	I
Ependimoma	II
Ependimoma papilar	II
Ependimoma de células claras	II
Ependimoma tancítico	II
Ependimoma fusión RELA positivo*	II/III
Ependimoma anaplásico	III

*Señaladas en rojo: Entidades eliminadas en la clasificación de 2016. * Señaladas en morado: Nuevas entidades y variantes añadidas en la clasificación de 2016. NOS: *Not otherwise specified*. Gen IDH: Isocitrato deshidrogenasa. SHH: Hace referencia a la vía de señalización *Sonic Hedgehog*. WNT: Hace referencia a la vía de señalización *Wingless*. Mut: *mutado*. WT: *Wild type*^{8,25}.

2.2. Tumores cerebrales en la edad pediátrica

2.2.1. Epidemiología de los tumores cerebrales infantiles

Los tumores cerebrales que se diagnostican en la edad pediátrica comparten todas las características referidas hasta el momento con los tumores del adulto, pero difieren de forma radical en su naturaleza intrínseca, lo que se refleja en su diferente predilección en la localización dentro del SNC, imagen radiológica, tipos histológicos y como no, en las vías moleculares afectadas²⁶.

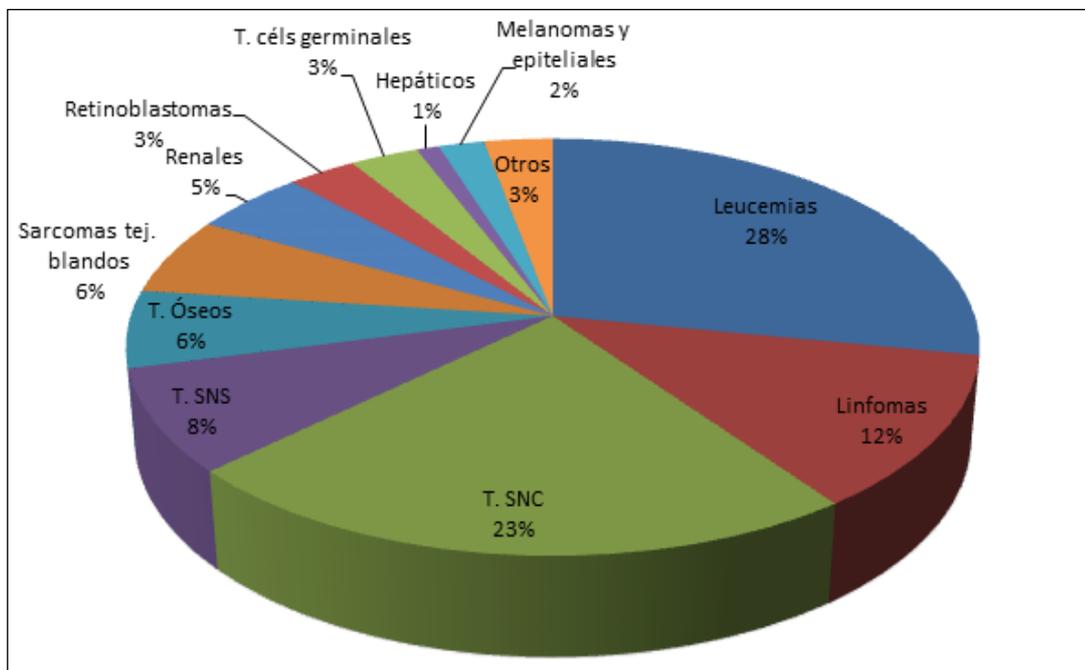
Los tumores del SNC son los tumores sólidos más frecuentes en la infancia, por detrás del subgrupo de procesos neoplásicos hematológicos (leucemias y linfomas) (figura 1) y los que más mortalidad asocian en este grupo de edad^{24,27}.

La incidencia en España de cáncer infantil y del subgrupo de tumores cerebrales es superponible con otros países de Europa como Alemania, Francia o Reino Unido, siendo la tasa estandarizada de 159,4 casos por millón de niños/niñas y en torno a 36 x millón respectivamente²⁸. Esto se traduce en una media unos 280 casos al año en España, incidencia que se mantiene estable en la última década²⁹.

Además, los tumores cerebrales comprenden el tipo neoplasias de las cuales se deriva la mayor morbi-mortalidad secundaria a cáncer en la edad pediátrica.

Se estima que el 80% de los niños con antecedentes de un tumor cerebral experimentarán algún tipo de morbilidad a largo plazo, derivados tanto de los síntomas ocasionados por el propio tumor, como de los tratamientos aplicados³⁰.

Figura 1. Incidencia en España por grupos diagnósticos de cáncer infantil.



Datos recogidos de informe RETI, años 2010-2017. Total de casos 8.248²⁹.

2.2.2. Etiopatogenia de los tumores cerebrales infantiles

Aunque los factores implicados en su patogenia siguen siendo una incógnita en la mayoría de los casos, sí es conocida la predisposición de pacientes afectos de ciertos síndromes genéticos a desarrollar tumores cerebrales, tales como la neurofibromatosis tipo 1 (NF-1), esclerosis tuberosa, síndrome de Li-Fraumeni y otras afecciones hereditarias menos comunes, como el síndrome de Gorlin o el síndrome de Turcot^{31,32}.

Se estima que entre el 8 y 10% de los pacientes pediátricos con cáncer presentan alguna alteración en línea germinal que les predispone a ello³³.

En cuanto a los factores de riesgo ambientales, sólo la exposición a radiación ionizante ha demostrado relación en el desarrollo de tumores cerebrales³⁴.

2.2.3. Clasificación de los tumores cerebrales infantiles

Como venimos haciendo hincapié, **los tumores cerebrales del adulto difieren significativamente de los de los pediátricos.**

Desde el punto de vista histológico, en adultos, los meningiomas de carácter benigno comprenden el mayor número de casos, siendo los gliomas de alto grado (glioblastoma) de localización supratentorial, los tumores agresivos más frecuentes, mientras que **en la edad pediátrica, los gliomas de bajo grado son los tumores más prevalentes, abarcando un 30% del total de casos registrados.** Los tumores malignos más frecuentes en este grupo de edad son los meduloblastomas, seguidos de los gliomas de alto grado, localizándose ambos tipos tumorales preferentemente a nivel infratentorial^{26,35}.

Los gliomas de bajo grado, definidos por la OMS como grado I (bajo potencial proliferativo) y II (bajo potencial proliferativo pero infiltrativo) comprenden un grupo muy heterogéneo de tumores. La entidad más prevalente en niños y adolescentes es el astrocitoma pilocítico (PA) (grado I), que supone un 15% de todos los tumores cerebrales en la edad comprendida entre 0 y 19 años³⁶. Otros gliomas de grado I, menos frecuentes, corresponderían a gangliogliomas, los astrocitomas /gangliogliomas desmoplásicos infantiles, los tumores disembrioplásicos neuroepiteliales, gliomas angiocéntricos y los astrocitomas subependimarios de células gigantes (SEGA). Entre los de grado II, destacan el astrocitoma pilomixoide (PMA), xantastrocitoma pleomórfico (PXA), oligodendroglioma, oligoastrocitoma y los astrocitomas difusos³⁷.

Los tumores gliales de alto grado, a pesar de no ser uno de los grupos de tumores del SNC más frecuentes en niños (abarcen el 11% de los casos de tumores cerebrales), **son los que más mortalidad** asocian en conjunto.

Los tumores gliales de alto grado engloban tanto **los gliomas difusos anaplásicos**, entre los que destaca el glioma pontino intrínseco difuso (DIPG), específico de la edad pediátrica y definido por unas características clínicas y radiológicas específicas, como los **glioblastomas**³⁸. Estos tumores presentan una mediana de supervivencia global de 9 a 15 meses, la cual no se ha conseguido mejorar en las últimas décadas³⁹.

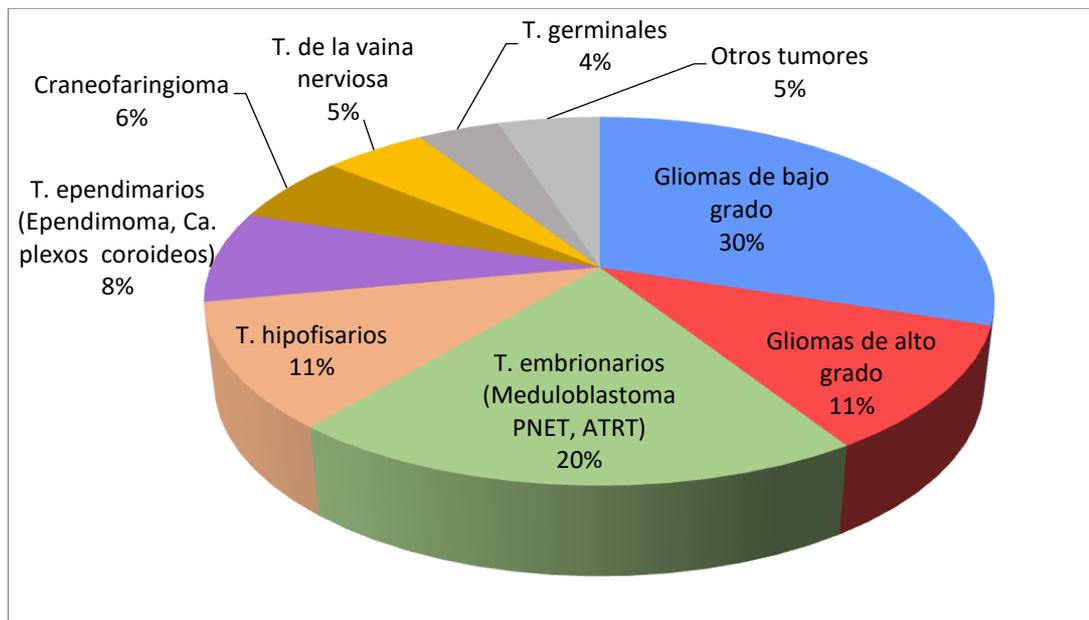
Aproximadamente la mitad de los gliomas difusos de alto grado en la edad pediátrica se localizan en estructuras de la **línea media**, como protuberancia y tálamo, hecho que les confiere escasa accesibilidad quirúrgica y, por tanto, un peor pronóstico. Este hecho contrasta con los adultos, en los cuales la localización predilecta son los hemisferios cerebrales.

La clasificación de la OMS de tumores cerebrales (tabla 1) **es común para adultos y niños**, por lo que debido a las marcadas diferencias en estos dos grupos de pacientes, resulta algo engorrosa para el manejo de esta patología en la edad pediátrica, especialmente en el caso de los **gliomas**.

En la última actualización de 2016, la presencia de mutación en el gen *IDH*, codificador de la proteína isocitrato deshidrogenasa, define los subtipos moleculares en el grupo de los gliomas, siendo en la edad pediátrica un hallazgo excepcional. No obstante, la incorporación a la clasificación de la entidad “**glioma difuso de línea media H3K27M**”, exclusivo de la infancia, así como una primera aproximación a los subtipos moleculares de **medulloblastomas** y **ependimomas**, también propios de la edad pediátrica, supone un avance para este grupo poblacional^{8,40}.

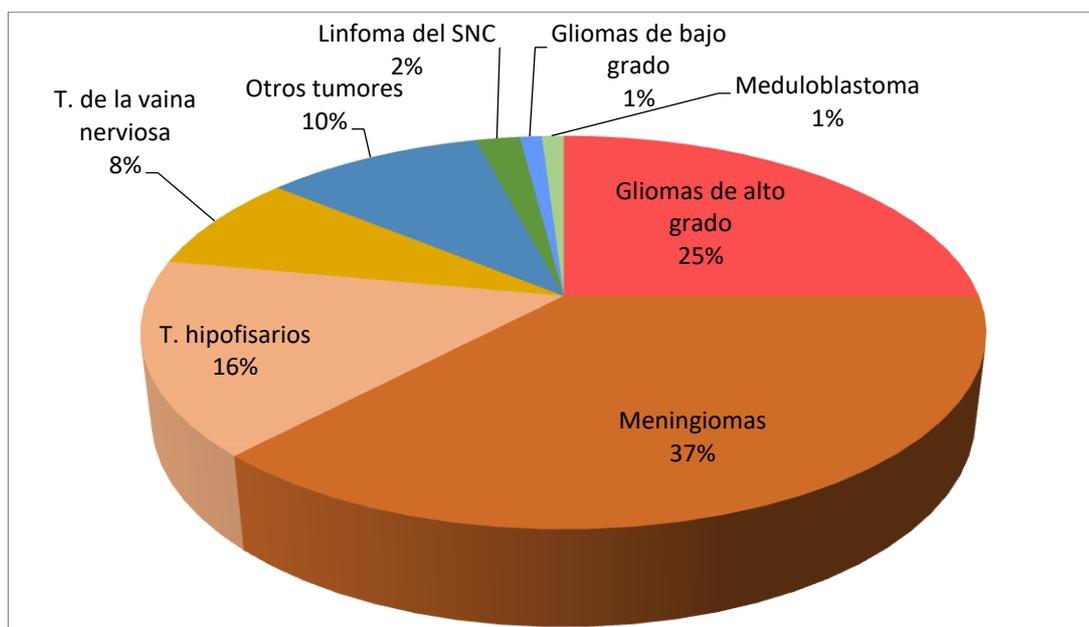
La **figura 2** ofrece, a modo de resumen, una aproximación en la incidencia de los tumores más frecuentes en la infancia, comparada con los subtipos más frecuentes en la edad adulta, representados en la **figura 3**³⁵.

Figura 2. Distribución en frecuencia de los diferentes subtipos de tumores cerebrales infantiles y del adolescente (edad 0-19 años).



Adaptado de *Ostrom QT et al. CBTRUS statistical Report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. Neuro Oncol. 2015*⁴¹

Figura 3. Distribución en frecuencia de los tumores cerebrales del adulto.



Datos extraídos de *Barnholtz-Sloan JS et al. Epidemiology of Brain Tumors. Neurol Clin. 2018;36(3):395-419*³⁵.

2.2.4. Pronóstico y tratamiento de los tumores cerebrales infantiles

A pesar de que el pronóstico global de los tumores cerebrales infantiles ha mejorado considerablemente en las últimas décadas debido a las mejoras en las técnicas diagnósticas y terapéuticas, esta patología representa la **causa más frecuente de muerte infantil por cáncer**, tal y como se ha referido anteriormente²⁷.

El **tratamiento** clásico de los tumores del SNC es **multimodal**, basado clásicamente en diferentes combinaciones de cirugía, radioterapia y quimioterapia⁴², terapias no exentas de posibles secuelas, hecho especialmente relevante en la edad pediátrica⁴³.

Hay que señalar que el **pronóstico de cada paciente es tan variable como la propia naturaleza tumoral**. La supervivencia global depende no sólo del tipo tumoral, sino también de la localización anatómica y, por tanto, de su accesibilidad quirúrgica.

En **gliomas de bajo grado** la supervivencia global a los 5 años es mayor del 75%, en los cuales la resección quirúrgica completa es suficiente para su curación en la mayoría de los casos. El problema surge con aquellos casos en los que no resulta posible realizar una resección macroscópica completa debido a su localización anatómica, convirtiéndose en una patología de carácter crónico, con la afectación secundaria en la calidad de vida que este hecho conlleva⁴².

En el otro extremo, se encuentran los **gliomas difusos de línea media**, con supervivencias muy pobres, incluso inferiores al año de forma invariable en los casos de DIPG, a pesar de las múltiples combinaciones de tratamientos que se han testado hasta la actualidad, representando el paradigma de tumor incurable en la infancia^{27,44}.

Si valoramos conjuntamente la mortalidad global, las secuelas a largo plazo secundarias al propio tumor y a la cirugía, junto con las derivadas de los

tratamientos adyuvantes, se pone de manifiesto la **necesidad de incorporar nuevas terapias** más eficaces que mejoren el pronóstico de estos tumores y con menos toxicidad. Esta necesidad cobra mayor relevancia, si cabe, en los pacientes pediátricos, ya que son más vulnerables a las diferentes agresiones debido a la etapa de desarrollo neurológico en la que se encuentran.

2.2.5. Alteraciones moleculares en los tumores cerebrales infantiles

Se conocía desde hace mucho tiempo que los tumores del niño diferían a los del adulto en cuanto a epidemiología, origen celular y respuesta a los diferentes tratamientos, pero los extraordinarios avances en la comprensión de la biología del cáncer han demostrado también las marcadas diferencias a nivel molecular.

Los estudios de secuenciación realizados a gran escala en los tumores pediátricos ponen de manifiesto que, tanto **las vías de señalización alteradas, como el número de mutaciones, difieren significativamente de las descritas en tumores del adulto**. La carga mutacional es mucho menor en niños, lo que condiciona la escasez de potenciales dianas terapéuticas^{18,45,46}.

Si se considera además el muy significativo menor número de pacientes pediátricos y la gran heterogeneidad de la naturaleza tumoral, condiciona que el diseño y planteamiento de ensayos clínicos con nuevos fármacos en este grupo poblacional resulte todo un reto, a menudo muy complicado de llevar cabo.

Por lo tanto, son muy escasos los nuevos agentes terapéuticos que consiguen la aprobación de la FDA (*The Food and Drug Administration*) o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para su uso en patologías oncológicas de la infancia y adolescencia⁴⁷, explicando el **enorme retraso en comparación a los avances en el tratamiento de los tumores del adulto**.

Aunque los estudios de diagnóstico molecular empiezan a formar parte del estándar de atención en muchas instituciones, la complejidad referida en el proceso de establecer terapias eficaces para el cáncer infantil, conduce a un amplio consenso por parte de las diferentes sociedades especializadas en oncología pediátrica (a modo de ejemplo: Children Oncology Group “COG” en EEUU, International Society of Paediatric Oncology “SIOP” o la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica “SEHOP”), de incluir a los pacientes en los diferentes estudios y ensayos clínicos multicéntricos^{48,49,50}.

Esta tendencia resulta especialmente interesante en aquellos casos en recaída o de mal pronóstico con las terapias convencionales,

El paso inicial a conseguir en este proceso cooperativo, es el obtener, mediante estudio de una muestra tumoral o biopsia, un diagnóstico lo más preciso, objetivo y completo. En el caso de los tumores infantiles resulta a menudo muy complejo, ya que muchas de estas neoplasias son altamente indiferenciadas o comparten características de diferentes líneas celulares, por lo que, tras el estudio morfológico e inmunohistoquímico inicial, se hace más indispensable si cabe, el aplicar una batería organizada de técnicas de **diagnóstico molecular**⁵¹.

A este respecto, destacan los esfuerzos realizados por grandes asociaciones, como la plataforma europea de prueba de concepto preclínica pediátrica de terapias innovadoras para niños con cáncer (ITCC-P4) y el consorcio de pruebas preclínicas pediátricas (PPTC) con sede en EE.UU. Ambos consorcios están desarrollando plataformas para evaluar de una forma sistemática y rigurosa las posibles dianas moleculares en los diferentes tipos de cáncer infantil para acelerar el proceso de aprobación de fármacos dirigidos. Sin embargo, todavía se requiere mucho trabajo de fondo y promoción para conseguir llevarlo a cabo⁴⁶.

En la **tabla 2**, se ofrece un resumen de las principales alteraciones genéticas en los diferentes tumores cerebrales infantiles y las terapias dirigidas que se encuentran actualmente en estudio^{22,46,52,53}.

Tabla 2: Principales alteraciones genéticas y entidades descritas en tumores cerebrales infantiles.

Subtipo tumoral	Entidades moleculares	Principales alteraciones genéticas	Terapias dirigidas en estudio	
Gliomas de bajo grado (LGG)	LGG BRAF mut	-Mut <i>BRAFV600E</i> -Mut o reord <i>FGFR1</i> -Aberraciones MYB/MYBL	-Inhibidores BRAF -Inhibidores MEK	
	LGG BRAF fus	-Fus <i>KIAA1549-BRAF</i>	-Inhibidores MEK	
	LGG BRAF WT	-Del <i>CDKN2A/p16</i>	-Inhibidores m-TOR	
Gliomas de alto grado (HGG)	HGG K27M mut o G34R/V mut	-Mut <i>H3F3A K27</i> o <i>H3F3A G34R/V</i> - <i>HIST1H3B</i> o <i>C</i> -Mut <i>TP53, FGFR1, ACVR1, PPM1D, PIK3, ATRX</i> -Reord <i>NTRK1, NTRK2</i> y <i>NTRK3</i> -Del <i>CDKN2A</i>	-Inhibidores HDAC -Inhibidores mTOR	
	Otros: HGG <i>BRAFV600E</i> +/- del <i>CDKN2A</i> , HGG H3 y BRAF WT	-Mut <i>BRAFV600E</i> -Amp <i>MYCN, PDGFRA</i> y EGFR	-Inhibidores BRAF -Inhibidores PARP Mtor y EGFR	
Meduloblastoma	WNT	-Mut <i>CTNNB1, DDX3X, SMARCA4, TP53, MLL2</i> -Monosomía cr 6	-WNT antagonistas	
	SHH (p53 WT o mut)	-Mut <i>PTCH1, TERT, SMO, SUFU, MLL2, DDX3X</i> y <i>TP53</i> -Amp <i>GLI1/2, MYCN</i> y <i>CCND2</i>	-Inhibidores SMO, GLI1/2, PIK3 y aurora quinasa -Inhibidores de MYCN	
	grupo 3	-Mut <i>SMARCA4, MLL2</i> -Amp <i>MYC, OTX2</i> -Fus <i>PVT1-MYC</i>	-Inhibidores HDAC y PI3K	
	grupo 4	-Mut <i>KDM6A, MML3, HDAC2, ZMYM3, CBFA2T2</i> y <i>CTDNEP1</i> -Dup <i>SNCAIP</i> -Amp <i>MYCN</i> y <i>CDK6</i>	-Inhibidores de MYCN, CDK -Moduladores epigenéticos	
Ependimoma (EPN)	Fosa posterior	EPN-A	Balanceado	-Inhibidores de HDAC -Inhibidores ERBB1/ERBB2
		EPN-B	Inestabilidad cromosómica	
	Supra-tentorial	EPN-YAP1	-Fus <i>YAP1</i> -Aberraciones Cr.11q	
		EPN-RELA	-Aberrations Cr. 11 -Fus <i>RELA</i>	
ATRT	ATRT-TYR	Del <i>SMARCB1</i> . Sobreexp gen melanosoma	-Inhibidores de aurora quinasa -Inhibidores de HDAC	
	ATRT-SHH	Aberraciones <i>SMARCB1</i> . Sobreexp vía SHH		
	ATRT-MYC	Del focales <i>SMARCB1</i> . Sobreexp MYC, HOX		

Nota tabla 2:

Mut: mutado. Reord: reordenamientos. Fus: fusiones. Dup: Duplicación Sobreexp: sobreexpresado. Del: deleción. Amp: amplificaciones. EPN: ependimoma. HGG: Gliomas de alto grado. LGG: Gliomas de bajo grado. mARN: microARN. WNT: Wingless. SHH *Sonic Hedgehog*. ATRT: Tumor teratoide-rabdoide atípico. TYR: tirosinasa. Cr: Cromosoma. HDAC: Histona desacetilasa. PARP: Poli-ADP ribosa

En los siguientes apartados (2.2.5.1. y 2.2.5.2.), se procederá a describir más detalladamente estos hallazgos moleculares en el subgrupo de gliomas infantiles, tanto de bajo como de alto grado, entidades más frecuentes en este grupo de edad y cuyas alteraciones genéticas características serán objeto de análisis en el presente trabajo de investigación.

2.2.5.1. Alteraciones moleculares en gliomas de bajo grado

La gran diferencia desde el punto de vista de naturaleza y biología molecular de los gliomas del niño con respecto a los gliomas del adulto, es la **ausencia de mutaciones en el gen *IDH***, siendo excepcional la transformación maligna hacia gliomas de alto grado^{42,54}.

La mayoría de los gliomas de bajo grado predominantes en la infancia, tienen alteraciones en la **cascada Ras/RAF/MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK (Extracellular signal-regulated kinase)**⁵⁵. Esta vía de señalización Ras/ERK es responsable de la regulación del crecimiento, proliferación y apoptosis celular y, su disfunción, conduce al desarrollo y mantenimiento tumoral, siendo una de las cascadas de transducción oncogénica mejor estudiadas y definidas en la biología del cáncer⁵⁶ (**figura 4**).

La vía Ras/ERK puede estar “hiper” activada constitutivamente por 2 mecanismos principales, de forma independiente a la regulación por factores externos.

El primer mecanismo activador es la **fusión entre los genes *KIAA1549* y *BRAF*** secundaria a la duplicación en tándem en 7q34 (**figura 5**).

Es la alteración genética más frecuente en estos tumores, presente en el 60-94% de los astrocitomas pilocíticos.

El segundo mecanismo activador es la **mutación puntual en el gen *BRAF***, en el exón 15 en el codón 600, (c.1799 T>A), que da como resultado un reemplazo de aminoácidos de valina a ácido glutámico, denominada BRAFV600E (**figura 6**).

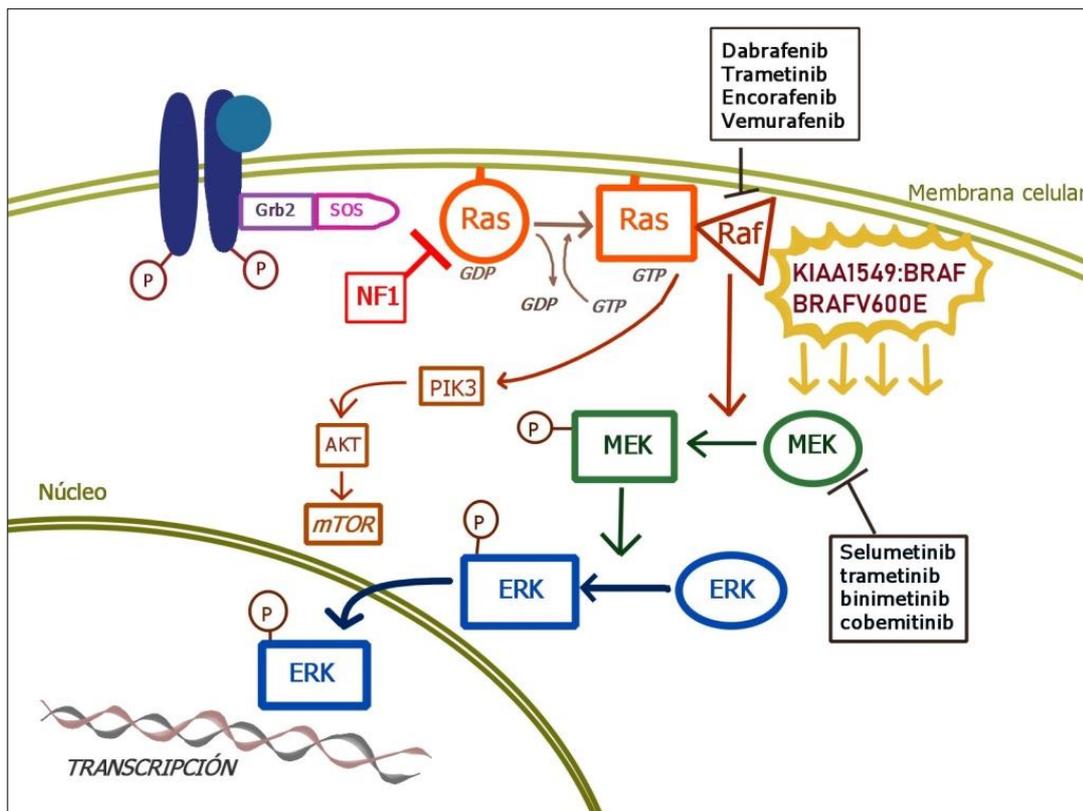
Esta mutación fue descrita inicialmente en el melanoma y se ha identificado en otros tipos de tumores propios del adulto, como el cáncer de tiroides, colorrectal o microcítico de pulmón, así como en diversos gliomas de bajo grado (hasta en un 66% de los casos de xantoastrocitomas pleomórficos, 18% de gangliogliomas y en 2–9% de astrocitomas pilocíticos)^{27,57–59}.

También debemos señalar que las alteraciones en *NF1* (gen supresor de tumores, codificante de la neurofibrina 1), predispone al desarrollo de gliomas de bajo grado (siendo típico el glioma de vía óptica) y tumores periféricos de la vaina nerviosa, hecho que se pone de manifiesto en niños afectados de neurofibromatosis tipo 1.

La pérdida de *NF1* origina la sobreactivación de la vía Ras/ERK y/o la vía de señalización PI3 K-AKT que modula la actividad de la vía mTOR, hecho que conlleva a una proliferación excesiva de las células gliales cerebrales y células de Schwann en el sistema nervioso periférico.

De hecho, a raíz del estudio de los mecanismos moleculares subyacentes en este síndrome de predisposición tumoral, se derivó la investigación dirigida hacia la vía Ras/ERK en el conjunto global de gliomas^{60,61}.

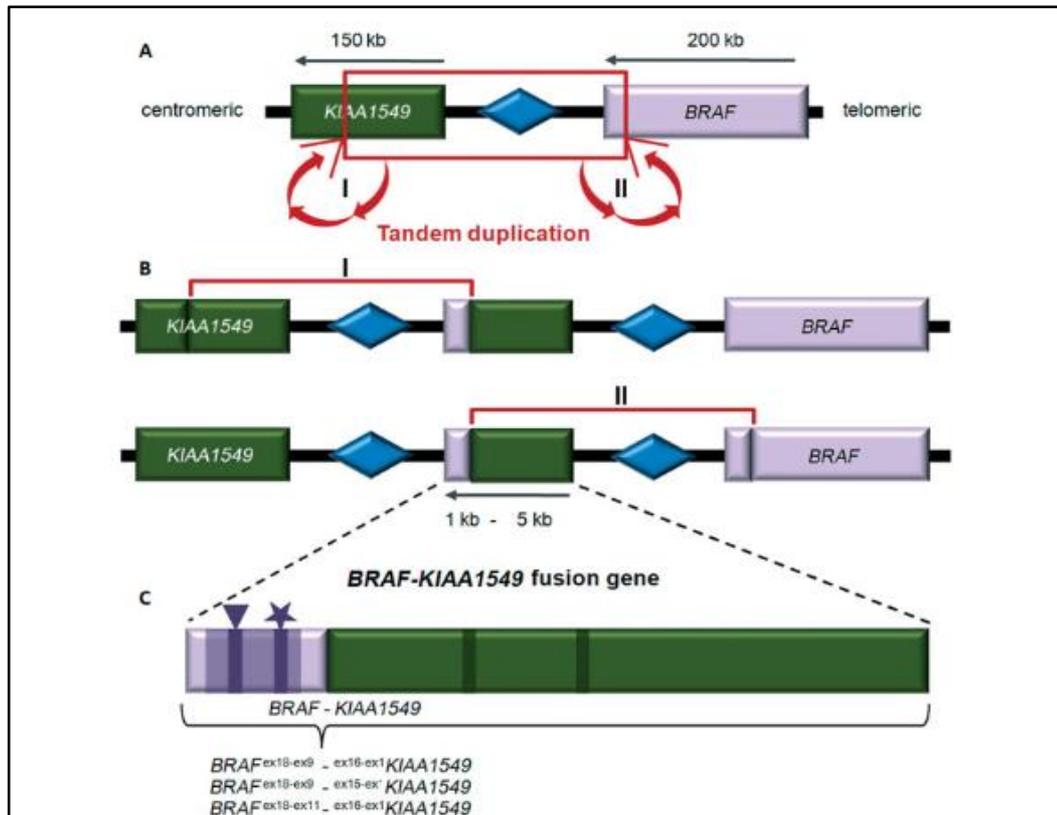
Figura 4. Descripción esquemática de la vía de señalización MAPK.



La señalización de MAPK se inicia en condiciones normales mediante la unión de un ligando extracelular a uno de los receptores transmembrana. El complejo receptor activado recluta al complejo Grb2-SOS (*Growth Factor Receptor-Bound Protein-2/Son Of Sevenless Proteins*). Este evento se produce en proximidad a Ras (proteína oncogénica p21) ubicada en el lado interno de la membrana celular, lo cual cataliza el intercambio de GDP a GTP. Este proceso puede ser revertido por NF1. Ras activada estimula a las proteínas quinasas RAF (entre ellas BRAF) y MEK, que actúan de forma secuencial y que culmina con la activación de la MAP quinasa (también denominada “ERK”).

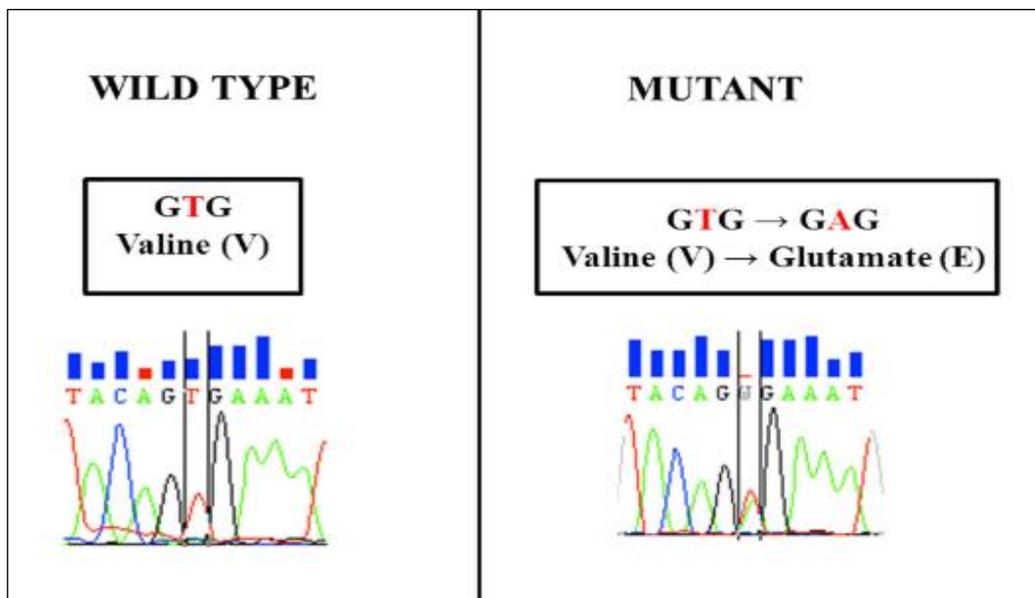
ERK es capaz de traslocarse al núcleo, para allí regular la transcripción, modulando así la expresión de distintos genes implicados en la regulación de la proliferación o la diferenciación celular entre otros. Esta cascada de señalización puede estar constitutivamente activa debido a la expresión de aberraciones que implican a *BRAF*, como el gen de fusión *BRAF-KIAA1549*, o la mutación puntual *BRAFV600E*, dando como resultado la fosforilación continua de MEK y la estimulación de la cascada de señalización sin la necesidad de una señal externa. Los inhibidores de BRAF o de MEK (indicados en color negro) son fármacos dirigidos a estas dianas moleculares⁶¹.

Figura 5. Representación esquemática de la fusión del gen KIAA1549-BRAF.



KIAA1549 y *BRAF* están representados en verde y morado, respectivamente. El diamante azul representa genes adicionales intermedios incluidos. (A): Regiones involucradas en la duplicación en tándem, que puede insertarse proximal (I) o distal (II) a la región duplicada. En este gen de fusión, se pierde el dominio de unión al inhibidor autorregulador de RAS. Extraído de *Jeuken JW et al. MAPK pathway activation through BRAF gene fusion in pilocytic astrocytomas; A novel oncogenic fusion gene with diagnostic, prognostic, and therapeutic potential. J Pathol. 2010;222(4):324-328*⁶².

Figura 6. Cromatogramas de secuencia mutante y de tipo salvaje (o *wild type* “WT”) del exón 15 de BRAF



La muestra portadora para la mutación BRAFV600E presenta la transversión de timina a adenina en la posición del nucleótido 1799, que da como resultado una sustitución de valina a glutamato en el residuo 600. Extraído de *Da Silva RC et al. BRAF overexpression is associated with BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinomas. Genet Mol Res. 2015;14(2):5065-5075*⁶³.

La relevancia de la presencia de la **mutación BRAFV600E** en los gliomas pediátricos de grado bajo radica en que la tasa de supervivencia libre de progresión a 10 años disminuye en casi un 40%⁶⁴, sin embargo, **su detección posibilita el uso de fármacos dirigidos que han mostrado una respuesta satisfactoria y por tanto una mejoría en su pronóstico**^{65,66}. Estos fármacos dirigidos son inhibidores de esta vía de señalización Ras/ERK. Entre ellos, los denominados **inhibidores de MEK** como el trametinib, **y de BRAF**, como el dabrafenib (GSK2118436), encorafenib (LGX818) y vemurafenib (PLX4032), ya han sido aprobados por la FDA y la EMA para el tratamiento de tumores del adulto, como el melanoma metastásico o el cáncer de tiroides e incluso están pasando a utilizarse cada vez más como tratamiento de primera línea⁶⁷⁻⁶⁹.

Basándose en el éxito en adultos, se han ido incorporando estos fármacos a ensayos clínicos en gliomas de bajo grado, en población pediátrica.

Los resultados preliminares para los **inhibidores de MEK** son prometedores, independientemente de la alteración molecular activadora de la cascada subyacente, teniendo en cuenta que el beneficio y la toxicidad a largo plazo aún son desconocidos. Entre los inhibidores de MEK que están siendo testados se encuentra el selumetinib (estando ya en activo ensayos fase III y aprobado recientemente por la FDA para el tratamiento de pacientes con neurofibromatosis tipo1 y neurofibromas plexiformes⁷⁰) y otros en fases I-II como el trametinib, binimetinib o cobemitinib^{71,72}

Los **inhibidores de BRAF** (dabrafenib o vemurafenib) también están obteniendo buenos resultados en los casos de pacientes con tumores cerebrales portadores de la mutación BRAFV600E, pero es importante señalar que los inhibidores de BRAF de primera generación originan una activación paradójica de la vía Ras/ERK en los tumores con la fusión de *BRAF*, lo que conduce a una aceleración del crecimiento tumoral, hecho que se puso de manifiesto en los primeros ensayos clínicos. Por lo tanto, los tumores positivos para la fusión BRAF han sido excluidos del tratamiento con inhibidores de BRAF^{67,73}.

2.2.5.2. Alteraciones moleculares en gliomas de alto grado

Remarcando esta divergencia entre ambos grupos de pacientes, a pesar de que a nivel histológico los gliomas de alto grado son similares en el niño y en el adulto, se ha ido poniendo de manifiesto la diferente biología subyacente, inicialmente de forma indirecta por el escaso éxito terapéutico con agentes extrapolados de ensayos clínicos del adulto, y más recientemente, por la identificación de los diferentes perfiles moleculares asociados a distintas edades de aparición, distribución anatómica y evolución clínica.

Como se ha referido anteriormente, tanto la existencia de mutaciones en IDH como de gliomas agresivos, desarrollados a partir de tumores de bajo grado, es anecdótico en la población infantil⁷⁴.

Los gliomas de alto grado en la edad pediátrica está caracterizado por la existencia de mutaciones recurrentes en genes codificantes de las histonas H3.3 y H3.1^{75,76}, descritas en el año 2012, y definen una entidad específica (glioma difuso de línea media H3K27M), recogida en la última clasificación de tumores cerebrales de la OMS⁸. Esta entidad es considerada de alta agresividad (grado IV), independientemente de los hallazgos histológicos.

Las histonas son proteínas nucleares que, junto con el ADN, forman complejos denominados nucleosomas. Inicialmente, se creía que estas proteínas eran meras estructuras facilitadoras de la compactación del material genético. Posteriormente, se ha evidenciado su implicación en la regulación de la replicación, la transcripción, y almacenamiento del ADN, revelándose el importante papel que cumple la epigenética en la génesis de estos tumores.

Investigaciones recientes sobre el genoma de los gliomas difusos pediátricos, han identificado tres tipos de mutaciones recurrentes,

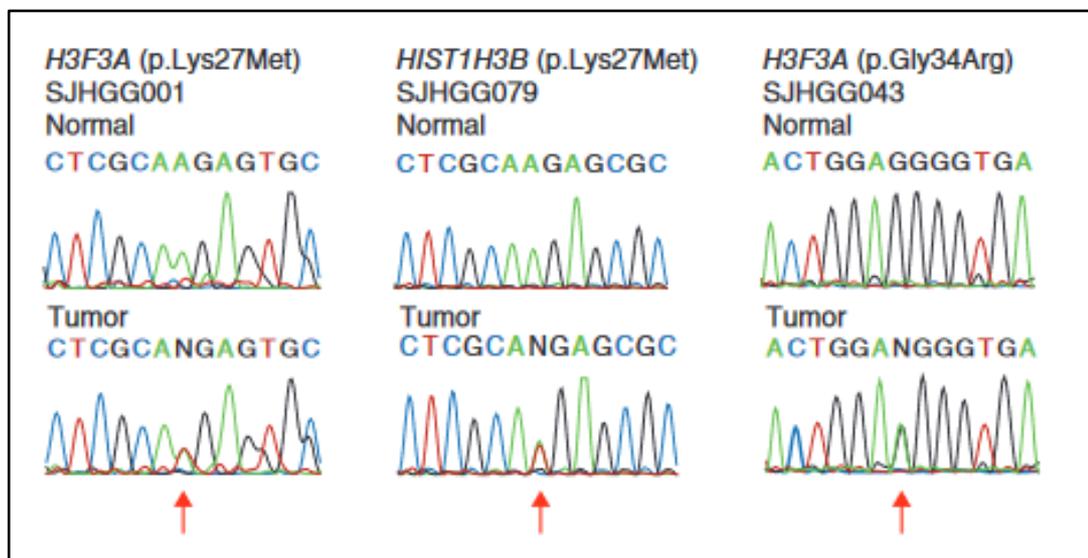
mutuamente excluyentes, tanto en el gen *H3F3A* codificante de la histona H3.3, como en el gen *HIST1H3B*, codificante de la isoforma H3.1 (**figura 7**).

Dos de estas mutaciones se incluyen en la denominación H3K27M, afectando al aminoácido 27 de las histonas H3.3 o H3.1 (bien por mutación en *H3F3A* o en *HIST1H3B* respectivamente), resultando en un reemplazo de lisina por metionina (K27M).

La tercera mutación descrita afecta también al gen *H3F3A*, pero originando una sustitución del aminoácido glicina por valina o arginina en posición 34 (G34V/R)⁷⁷.

Tanto K27 como G34 se localizan en el extremo N-terminal de la histona H3, zona cuyos residuos de aminoácidos resultan críticos para la modificación de histonas postraduccionales. Como resultado, las mutaciones H3K27M y H3G34V acarrearán un impacto significativo en la regulación de la transcripción y en el proceso de metilación de estas proteínas, influyendo de forma definitiva en el proceso oncogénico de estos tumores.

Figura 7. Cromatogramas de secuenciación de H3.

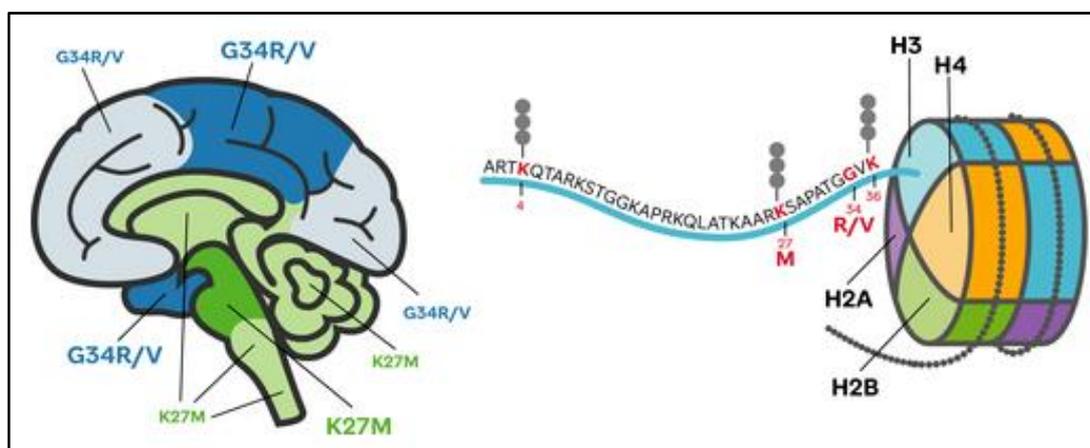


Se muestran las mutaciones (señaladas con flechas) de *H3F3A* o *HIST1H3B* que codifican una sustitución p.Lys27Met o la mutación *H3F3A* que codifica una sustitución p.Gly34Arg en diferentes tumores. N indica la presencia de A y T para la alteración p.Lys27Met y de G y A para la alteración p.Gly34Arg. Extraído de Wu G *et al.* *Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas.* *Nat Genet.* 2012;44(3):251-253⁷⁶.

Estas alteraciones genéticas determinan subgrupos tumorales que difieren tanto en localización como en edad de presentación y pronóstico (figura 8). Los tumores portadores de la mutación **H3.3G34R/V** se originan predominantemente en los hemisferios cerebrales (describiéndose dicha mutación en el 15% de los gliomas difusos en esta localización), se dan en adolescentes y adultos jóvenes y tienen una supervivencia global mayor en comparación a los otros grupos con mutaciones en H3.

Por otro lado, los tumores **H3K27M** se distribuyen en línea media (describiéndose dicha mutación en un 80% de los gliomas difusos en esta localización), se dan en pacientes **más jóvenes** que los H3.3G34R/V (de 0 a 14 años) y presentan un **peor pronóstico**, con menor supervivencia global. Los tumores con mutaciones en H3.1 resultan altamente específicos para la localización en protuberancia y representan el grupo de edad más joven (media de 5 años de edad) con una supervivencia ligeramente más larga (mediana de 15 meses en comparación a los 11 meses de H3.3)⁷⁸.

Figura 8. Representación de las localizaciones preferentes de las mutaciones de H3 en los gliomas de alto grado.



La mutación H3K27M se representa en verde y la H3G34R/V se representa en azul con mayor o menor intensidad de color según la prevalencia. A la derecha se representa un nucleosoma, mostrándose la localización de las alteraciones en H3 descritas en el texto. Extraído de Kasper LH et al. *Invited Review: Emerging functions of histone H3 mutations in paediatric diffuse high-grade gliomas. Neuropathol Appl Neurobiol.* 2020;46(1):73-85.⁷⁹

Otros estudios de secuenciación del exoma completo de gliomas de alto grado pediátricos, han identificado mutaciones en el gen alfa-talasemia/síndrome de retraso mental ligado al cromosoma X (*ATRX*) en un 14% -29% y en el gen *DAXX* (*Death Domain Associated Protein*) en un 34%. Estas mutaciones en *ATRX* y / o *DAXX* tienen una fuerte asociación con mutaciones en *TP53* y el alargamiento alternativo de telómeros (ALT), ambos mecanismos implicados en el proceso oncogénico. También se han descrito mutaciones en *AVCR1* (*Activin A Receptor Type 1*) y en *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1*) asociados a las mutaciones H3K27M en gliomas pediátricos de línea media⁸⁰.

La activación de mutaciones de *BRAF*, como BRAFV600E, también están presentes en el 10% -25% de los pacientes pediátricos con gliomas de alto grado⁸¹.

El extraordinario avance en el conocimiento de la naturaleza molecular de estos tumores abre las puertas al desarrollo de nuevas terapias dirigidas, en las cuales multitud de expertos dirigen los esfuerzos de sus investigaciones actualmente, encontrándose todos los agentes testados hasta ahora en fases I-II principalmente, destacando el área activa de investigación en el uso de inhibidores de histona desacetilasa (HDAC)^{27,82,83}.

3. Acceso a la información histopatológica y molecular del tumor: la biopsia

3.1. La biopsia sólida

El primer paso en el manejo de los tumores cerebrales es, si es posible, **obtener una muestra tumoral** (biopsia) para realizar el diagnóstico más preciso tanto a nivel histopatológico como molecular.

El término biopsia se deriva del griego Bios: Vida y Opsi: Visión.

Viajando en el tiempo al siglo XIX, cuando se reconoció que era posible anticipar los hallazgos postmortem y realizar diagnósticos fiables a partir del examen de muestras de tejidos vivos, surge la disciplina de la patología quirúrgica en el seno de la anatomía patológica con la toma de biopsias. Se avanza por tanto de una ciencia descriptiva, retrospectiva y académica a una disciplina práctica y prospectiva.

Aunque las primeras experiencias en esta práctica estuvieron en manos de cirujanos a mediados y finales del siglo XIX, como Carl Ruge o Friedrich August von Esmarck, el verdadero desarrollo de la patología quirúrgica como disciplina surgió del trabajo de los patólogos americanos Francis Delafield (1841-1915), William Henry Welch (1850-1934), James Swing (1866-1943), Arthur Purdy Scout (1885-1967) y Lauren Ackerman (1905-1993)⁸⁴.

Se comienza a avanzar significativamente en la obtención y en el estudio anatomopatológico de muestras tumorales, y en las últimas décadas, de forma paralela a los avances en el conocimiento de la biología de los diferentes tumores, se van añadiendo técnicas innovadoras de inmunohistoquímica y de biología molecular que ofrecen un diagnóstico más preciso para así adecuar el tratamiento óptimo para cada paciente.

En el caso de ciertos **tumores cerebrales**, como los localizados en línea media, característicos de la edad pediátrica, debido a las estructuras anatómicas básicas afectadas y a la naturaleza infiltrativa de estas

neoplasias, la resección quirúrgica no es factible y en algunos casos ni siquiera la obtención de biopsia⁸⁵.

En esos casos, el diagnóstico se ha basado clásicamente en la sintomatología del paciente y en la imagen radiológica del tumor por resonancia magnética (RM)⁸⁶, práctica claramente insuficiente en el manejo clínico actual de esta patología.

Por ello, para estos tumores, se están desarrollando diferentes estrategias para la determinación de biomarcadores, tales como la biopsia guiada por esteroataxia⁸⁷, o el aislamiento de material genético del tumor en **biopsias líquidas**⁸⁸, técnica todavía en desarrollo para el caso de los tumores cerebrales y en la cual se ha basado el presente trabajo de investigación.

3.2. La biopsia líquida

3.2.1. Concepto y desarrollo de las biopsias líquidas

El término "biopsia líquida", es una técnica no invasiva, con aplicación en el campo de la oncología, y que consiste en el **estudio del material liberado a partir del tumor al ambiente extracelular y de ahí a los diferentes fluidos corporales**^{89,90}.

La fuente más importante a estudio es la sangre, pero se puede encontrar este material en otros biofluidos, como el líquido cefalorraquídeo (LCR), cuyo estudio se encuentra en aumento en los últimos años^{91,92}, orina, líquido pleural⁹³, saliva o incluso humor vítreo⁹⁴.

El análisis de este material liberado tiene como objetivo la determinación de biomarcadores.

Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) los **biomarcadores** se definen como aquellas moléculas biológicas que se pueden encontrar tanto en los diferentes fluidos biológicos como en los tejidos, y que pueden medirse y evaluarse objetivamente como un signo de un proceso o condición biológica fisiológica o patogénica.

Estos biomarcadores pueden resultar útiles en el manejo de ciertas patologías, bien como método de *screening*, diagnóstico, determinación de pronóstico o como seguimiento de la respuesta a las diferentes intervenciones terapéuticas⁹⁵.

El uso de biomarcadores detectados en sangre no es una práctica novedosa en el campo de la oncología del adulto, hecho que invita a la reflexión sobre la innovación aportada por la ahora denominada "biopsia líquida" en comparación a la detección y cuantificación de los marcadores proteínicos clásicos, como por ejemplo el antígeno de carcinoma 125 (CA-125), el antígeno carcinoembrionario (CEA) o el antígeno prostático específico (PSA), entre otros^{96,97}.

La diferencia fundamental es la mayor especificidad que se alcanza mediante la biopsia líquida y el gran valor potencial de la información obtenida mediante esta técnica, ya que **fundamentalmente se analiza material genético derivado de la propia célula tumoral**, accesible hasta ahora únicamente mediante el estudio directo del tejido tumoral⁸⁹.

La primera vez que se describió la presencia de ADN libre circulante en sangre de un ser humano fue en **1948**, con la publicación del manuscrito *“Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l’homme”* por Mandel y Matais⁹⁸.

En el año 1996 se detecta **ADN circulante tumoral** (ctDNA) en pacientes con cáncer de pulmón⁹⁹, pero no es hasta la pasada década cuando se demuestra el gran potencial de este descubrimiento, introduciéndose el **concepto de “biopsia líquida” en el año 2010**⁹⁰.

El material genético del tumor en estos biofluidos puede encontrarse en el interior de **células tumorales circulantes** (TCTs), en forma de **fragmentos pequeños de ADN** (entre 70 y 200 pares de bases) o **ARN y microARNs** (moléculas de ARN pequeñas no codificantes que regulan la expresión de muchos genes y que se encuentran alterados en multitud de patologías).

Estas moléculas circulantes de ADN y ARN derivadas del tumor pueden aparecer **libres** (ctADN or ctARN) **o en el interior de vesículas extracelulares** (EVs)^{100,101,102} (**figura 9**).

El **ctADN** representa del 0,01 al 10% del total de ADN circulante libre en la sangre, dependiendo de la actividad mitótica del tumor, el tratamiento y el acceso del tumor a los biofluidos¹⁰³.

Las **Evs** son vesículas membranosas liberadas a partir de cualquier tipo celular tras su activación o apoptosis, y juegan un papel importante en la comunicación intercelular, tanto entre células vecinas como a distancia.

Según el tamaño y su biogénesis, las EVs se clasifican en exosomas, ectosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, y contienen todo tipo de ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y metabolitos¹⁰⁴.

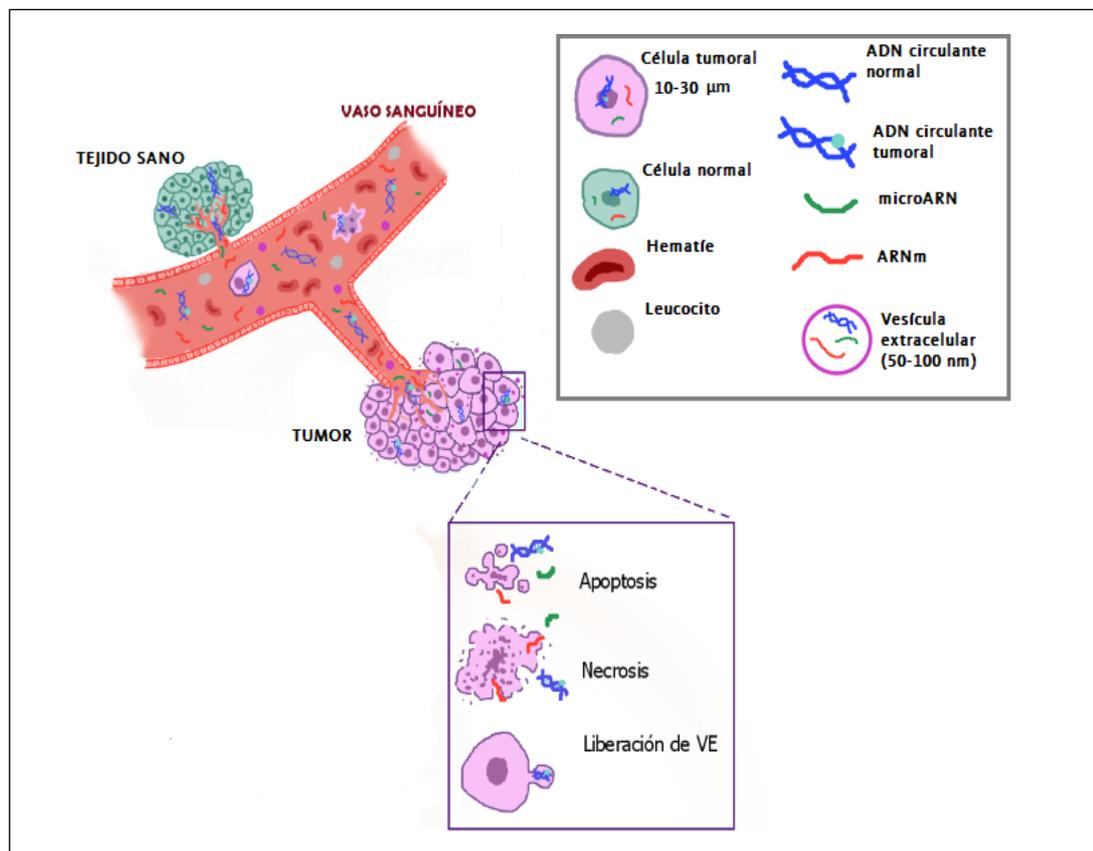
Se desconoce con exactitud el proceso por el cual el este material genético intracelular alcanza la circulación sanguínea.

La mayoría de estudios señalan, como principal mecanismo implicado, la liberación a partir de células en apoptosis o tejidos necróticos sometidos a diferentes procesos fisiológicos y patológicos¹⁰⁵, pero también se postula la secreción activa¹⁰⁶.

Lo que sí se conoce desde hace décadas, es que la cantidad de ADN circulante es mayor en pacientes con cáncer¹⁰⁷, y que dentro o de esta subpoblación, tienen más cantidad de ADN circulante los pacientes con mayor carga tumoral. Al aumento de ADN circulante contribuye principalmente el ADN liberado por el tumor (ctADN), mientras que el ADN de línea germinal permanece constante¹⁰⁸.

Todo este material circulante refleja la composición genética de la célula de la cual deriva y por tanto, en el caso de ser ésta una célula tumoral, podremos identificar alteraciones moleculares características de la misma, representantes de la biología tumoral.

Figura 9. Material genético circulante disponible para análisis mediante biopsia líquida.



Las células tumorales secretan material genético al torrente circulatorio (ctADN, ctARN, microARN) mediante diferentes mecanismos (apoptosis, necrosis o liberación activa). Además este material circulante se encuentra en el interior de vesículas extracelulares y de CTC. En la circulación sanguínea, todo este material derivado del tumor se mezcla con los demás elementos circulantes presentes en condiciones normales. Mediante técnicas de biología molecular altamente sensibles podemos detectar esta información de la neoplasia a estudio.

3.2.2. Ventajas en el uso de la biopsia líquida

Una de las principales ventajas de la aplicación de las biopsias líquidas es la **accesibilidad** en su obtención. Resultan mucho menos invasivas que las biopsias convencionales, evitando la morbilidad asociada a éstas, y con menor coste⁹³.

Otra de las ventajas de esta técnica en el campo de la oncología, es la obtención de información con **mayor representatividad** de la biología de todo el tumor en su conjunto, evitando así los posibles sesgos del análisis de muestras parciales del tumor en el caso de las biopsias sólidas, derivadas de la conocida heterogeneidad temporo-espacial tumoral^{109,110}.

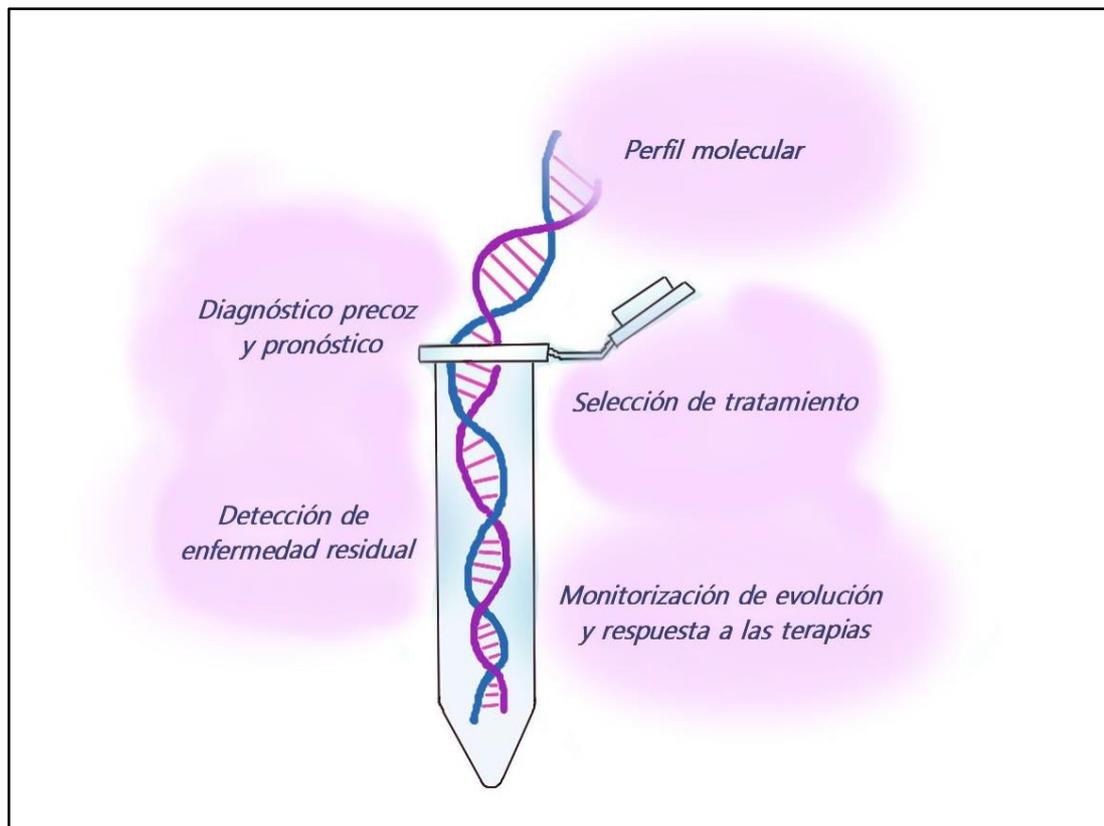
Los tumores presentan una gran diversidad en su población celular, con características distintivas no sólo en cada tipo de tumor, sino en cada paciente en concreto, distribuída además de forma irregular en el total del volumen celular. Además, sufren la denominada “evolución clonal” que origina nuevas células cancerígenas durante el desarrollo de la enfermedad, con características genéticas diferentes, que pueden no ser detectados en el análisis inicial, puntual, de la pieza tumoral al diagnóstico¹¹¹.

Como se ha referido previamente, las células tumorales liberan material portador de información específica, y esta liberación se produce a lo largo de toda la evolución de la enfermedad⁸⁹. La recortada vida media de este material circulante y la accesibilidad en la obtención de las muestras de las diferentes fuentes líquidas, ofrece la oportunidad de acceder a esos datos moleculares a **tiempo real**, es decir, de forma continuamente actualizada¹⁰³.

Este hecho permitiría disponer, por tanto, de un diagnóstico más precoz, preciso y completo desde el punto de vista molecular del tumor, facilitando la **adecuación del tratamiento**, bien desde el punto de vista de estratificación del riesgo de cada paciente, como de utilización de fármacos dirigidos.

Además, permitiría conocer las posibles modificaciones en el perfil molecular a lo largo del tiempo, ofreciendo la oportunidad de seguimiento de la respuesta a los tratamientos administrados, seguimiento de enfermedad mínima residual, detección de posibles recaídas o progresiones de la enfermedad con mayor precocidad y sensibilidad que los biomarcadores clásicos y pruebas de imagen^{93,112}.

Figura 10. Aplicaciones y ventajas de la biopsia líquida.



3.2.3. Estado actual de la biopsia líquida en el manejo del cáncer

En tumores del adulto, la biopsia líquida se encuentra en pleno desarrollo como parte del concepto de **medicina de precisión**, aplicándose progresivamente en la práctica clínica.

Actualmente, la FDA ha aprobado seis pruebas diagnósticas basadas en la técnica de biopsia líquida, en sangre (**tabla 3**)^{113–116}.

Es importante señalar que, la FDA, en el caso de los kits de secuenciación masiva *Guardant360 CDx* y *Foundation One Liquid CDx*, aprueba su aplicación para la definición del perfil molecular de todos los tumores sólidos en general, pero de momento, sólo algunos de esos marcadores moleculares detectados mediante esos dos métodos han obtenido la su aprobación como prueba diagnóstica con fines terapéuticos, como se expresa en el apartado “aplicación” de la tabla 3. Esto no implica que si existe un fármaco dirigido para alguna alteración molecular que no disponga todavía de esta aprobación, no resulte eficaz.

Tabla 3. Pruebas diagnósticas basadas en biopsia líquida aprobadas por la FDA.

KIT/TEST	COMPAÑÍA	FECHA APROBACIÓN	ALTERACIÓN DETECTADA	APLICACIÓN
<i>CellSearch Circulating Tumor Cell Kit</i>	Menarini SiliconBiosystems	Agosto 2013	Cuantificación de CTC de origen epitelial	Pronóstico del cáncer de mama, colorrectal y de próstata
<i>Epi proColon DNA methylation blood test</i>	Epigenomics AG	Abril 2016	Detección de citosinas metiladas en el gen SEPTIN9 en ctDNA mediante PCR a tiempo real (qPCR).	Cribado del cáncer de colon
Cobas EGFR Mutation Test v2	Roche Diagnostics	Junio 2016	Detección de 42 mutaciones en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en ctDNA por qPCR	Orientar en la selección de tratamiento en el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)

KIT/TEST	COMPAÑÍA	FECHA APROBACIÓN	ALTERACIÓN DETECTADA	APLICACIÓN
ClonoSEQ	Adaptive Bio-technologies	Septiembre 2016	Detección de reordenamientos de las inmunoglobulinas y regiones que suelen presentar translocaciones, en ctADN mediante PCR multiplex y secuenciación de alto rendimiento (NGS).	Detección de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica o en mieloma múltiple
Guardant360 CDx	Roche	Agosto 2020	Análisis en 73 genes implicados en diferentes tumores sólidos en ctDNA mediante NGS	Definición del perfil molecular de tumores sólidos. Aprobación FDA para dirigir tratamiento de NSCLC
Foundation One Liquid CDx	Roche	Octubre 2020	Análisis de 324 genes implicados en diferentes tumores sólidos en ctDNA mediante NGS.	Definición del perfil molecular de tumores sólidos. Aprobación FDA para dirigir tratamiento de NSCLC y cáncer de próstata

Las aplicaciones de la biopsia líquida en el campo de la **oncología pediátrica** van muy por detrás en comparación a la de la población adulta. Esto se debe, como hemos referido previamente, a la escasez de mutaciones recurrentes, tal y como sucede en la mayoría de los principales cánceres del adulto^{46,117}.

Existen varios **proyectos de investigación** en marcha que estudian de forma sistemática la capacidad de detección de alteraciones moleculares en ctADN en diferentes fuentes de biopsia líquida en población pediátrica con diferentes tipos de cáncer, a destacar el NCT 02546453 “*Use of Specific Genetic Alterations of Tumoral Cells Identified by the Next Generation Sequencing Techniques (NGS) to Follow Peripheral Samples of Children With Metastatic and/or High Risk Solid Tumor - NGSKids (NGSKids)*”¹¹⁸, el NCT03496402 “*Biological Characterisation of High Risk Childhood Cancer in Children, Adolescents and Young Adults (MICCHADO)*”¹¹⁹ o el NCT03336931 “*Precision Medicine for Children With Cancer (PRISM)*”¹²⁰.

Hasta la fecha, la mayor información sobre la técnica en niños se ha obtenido de series de pacientes con neuroblastoma, sarcomas, linfomas o tumores renales¹²¹.

En el caso del **neuroblastoma** se ha conseguido una alta sensibilidad y especificidad en la detección de marcadores pronósticos conocidos, como las variaciones en el número de copias, las mutaciones del gen *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase) y amplificaciones del gen *N-MYC*.

En algunos casos, se ha confirmado la existencia de estas alteraciones en el estudio de biopsia líquida, no detectadas en la biopsia sólida inicial. Este hecho afianza el concepto de mayor representatividad de todo el volumen tumoral en la información obtenida a partir del material genético circulante^{122,123}.

En el **sarcoma de Ewing**, se ha estudiado en sangre la detección de los reordenamientos del gen *EWSR1* (Ewing Sarcoma RNA Binding Protein 1), marcador molecular específico de esta neoplasia, para la monitorización de la respuesta al tratamiento recibido, entre otras aplicaciones¹²⁴.

Existen también algunos estudios sobre análisis de biopsias líquidas en linfomas pediátricos, en los cuales se objetiva un peor pronóstico en pacientes con linfoma Hodgkin con mayores niveles de ADN circulante¹²⁵.

En el caso del **tumor de Wilms** (neoplasia renal más frecuente en la infancia), en el que la biopsia diagnóstica conlleva un elevado riesgo de ruptura y diseminación tumoral, la posibilidad de disponer de algún biomarcador accesible que contribuya al diagnóstico diferencial con otros tumores renales, presenta un gran potencial en el manejo clínico de estos tumores. Los estudios recientes en la detección de duplicaciones en el gen *BCOR* en sangre periférica, específicas del sarcoma renal de células claras (segundo tumor renal maligno más frecuente en niños), suponen el inicio de esta interesante línea de investigación¹²⁶.

El papel de la biopsia líquida en tumores cerebrales cobra especial relevancia debido a la dificultad anatómica para obtener material tumoral mediante las biopsias sólidas convencionales y la morbi-mortalidad que puede acarrear dicho procedimiento, especialmente en tumores de difícil acceso, como es el caso de los localizados en línea media.

Al inicio de este proyecto de investigación, en el año 2016, la experiencia investigadora publicada sobre la aplicación de biopsias líquidas en tumores cerebrales era muy escasa y casi inexistente en población pediátrica¹²⁷.

Uno de los primeros estudios que se centró en pacientes con tumores cerebrales fue el llevado a cabo por **Balaña** et al., en el año 2003, cuando no se había establecido aún el concepto de biopsia líquida.

En este estudio se analizó ADN circulante aislado en suero de pacientes con glioblastoma multiforme para detectar, mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la hipermetilación de promotores de genes específicos (*MGMT*, *p16*, *DAPK* y *RASSF1A*). El estado de hipermetilación es un factor implicado en la respuesta al tratamiento quimioterápico, demostrando una buena correlación en el estado de metilación detectado en el suero y en las muestras de tejido sólido de los pacientes¹²⁸.

Posteriormente se han realizado multitud de estudios de forma paralela al desarrollo de nuestro proyecto¹²⁹, hecho que pone de manifiesto el potencial de intentar validar esta herramienta para la práctica clínica.

No obstante, aunque dicha técnica ofrece significativas ventajas, implica una serie de dificultades añadidas, secundarias precisamente a la propia estructura del SNC.

La barrera hematoencefálica (BHE), cuya función es el aislamiento del SNC de agresiones externas, restringe significativamente la cantidad de ADN circulante que se disemina hacia la sangre periférica. En relación a este

aspecto, el uso del LCR como biofluido alternativo a estudio en los tumores cerebrales, se muestra prometedor¹²⁹.

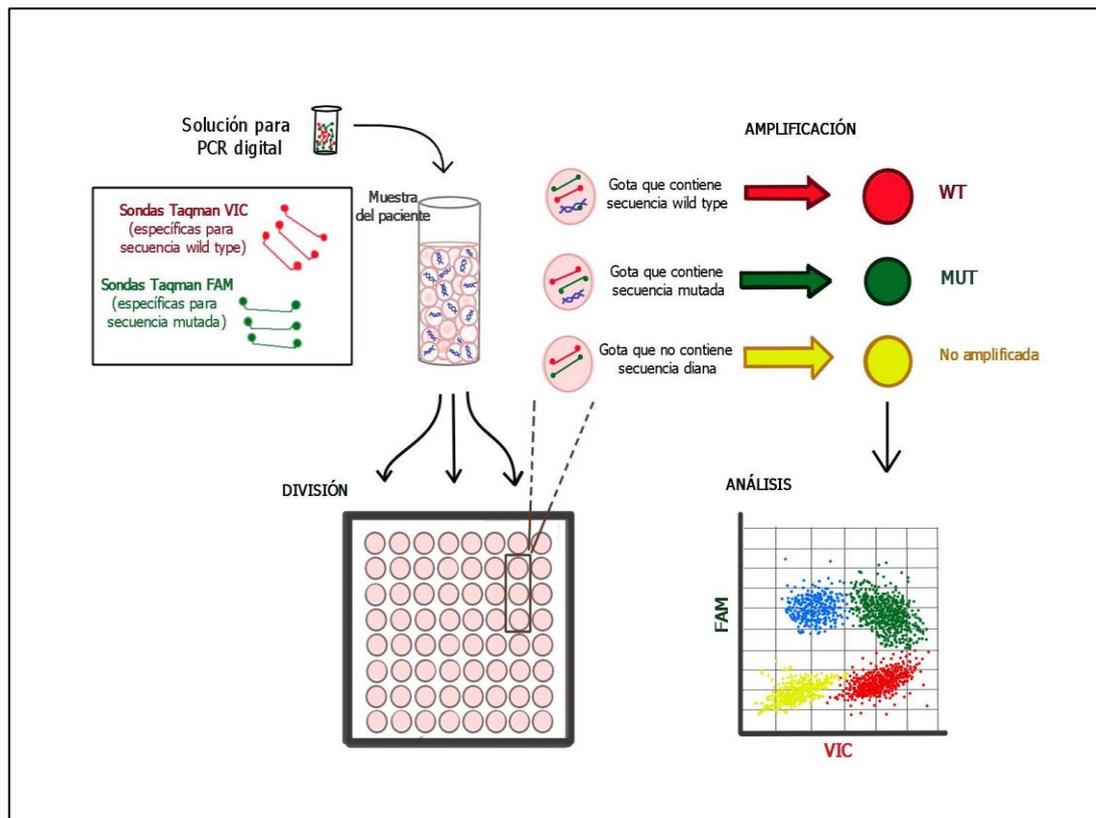
Hay que tener en cuenta, además, que el ADN circulante en pacientes con cáncer deriva de tres tipos celulares diferentes: las sanas no tumorales, las células “no malignas” del microambiente tumoral, y las tumorales “malignas”, y que la detección de las alteraciones genéticas se realiza a partir de todo ese *pool* de ácidos nucleicos que se ha conseguido aislar a partir del biofluido a estudio¹⁰⁸.

Por tanto, uno de los desafíos más relevantes a conseguir en la técnica de biopsia líquida, potenciado en el caso de los tumores cerebrales, y al que por tanto nos hemos enfrentado en este estudio, es el desarrollo y validación de métodos altamente sensibles que puedan detectar variantes alélicas de baja frecuencia⁹⁰.

Existen varias técnicas que aumentan de forma considerable la sensibilidad de las herramientas de detección molecular convencionales.

Entre ellas, destaca la PCR digital (dPCR), representada en la **figura 11**, como técnica ultrasensible capaz de detectar y cuantificar un alelo raro con una mayor eficiencia en comparación con los métodos tradicionales¹³⁰.

Figura 11. Esquema de la secuencia de la técnica de PCR digital.



Secuencia de técnica de PCR digital: Inicialmente se mezcla la solución específica de reactivos para PCR digital, que incluye sondas fluorescentes y cebadores (*o primers*) específicos de la secuencia a estudio, con *la muestra de ADN* del paciente. Esta mezcla se distribuye, en el caso de la dPCR convencional, en miles de compartimentos físicos, o en gotas en el caso de la ddPCR (*droplet digital PCR*), en cada una de las cuales teóricamente se distribuye una sola molécula de ADN. Posteriormente, se somete a ciclos térmicos y de amplificación, para finalmente analizar la intensidad de fluorescencia de cada gota individual, permitiéndose, de esta forma, detectar el porcentaje de secuencias mutadas, salvajes o no amplificadas. Basado en *Postel et al. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. Expert Rev Mol Diagn. 2018;18(1):7-17*¹³⁰.

EXPERIENCIA PREVIA E HIPÓTESIS DE TRABAJO

El grupo liderado por el Dr. Ángel Ayuso, del cual he formado parte para la consecución del presente trabajo, dispone de una reconocida experiencia investigadora en el campo de la neurooncología.

Destaca el desarrollo de modelos representativos de células madre cancerígenas (CSC)¹³¹, modelos murinos representativos de la histopatología de tres de las variantes principales de los tumores gliales del adulto, así como técnicas de identificación y aislamiento de marcadores moleculares de estos tumores, como es el caso de IDH1, en sangre periférica de estos modelos murinos y validadas posteriormente en cohortes de pacientes adultos^{100,132,133}.

Con esta amplia experiencia de base, se plantea el estudio de identificación mediante biopsia líquida de marcadores moleculares en tumores cerebrales infantiles, objeto de la presente tesis doctoral.

Nos hemos centrado en la detección de dos mutaciones con demostrado potencial en el manejo clínico de estos pacientes: la mutación V600E del gen *BRAF* y la mutación K27M de los genes *H3F3A* y *HIST1H3B*.

La mutación V600E de *BRAF* predominante en gliomas de bajo grado infantiles⁶⁷, aunque también presente, como hemos referido, en hasta un 25% de casos de gliomas de alto grado⁸¹ dispone de fármacos dirigidos, los denominados inhibidores de BRAF y de MEK, con demostrada eficacia terapéutica, tanto en su uso aislado como combinado^{134,135}.

La mutación H3K27M presente en hasta el 80% de los gliomas de línea media en la edad pediátrica, identifica un subtipo de tumores de alto grado con marcado mal pronóstico, reconocidos como entidad particular en la

vigente clasificación de la OMS^{77,78}, y para la cual se están llevando a cabo diversos proyectos de investigación para desarrollar fármacos dirigidos^{136,137}.

El primer paso establecido actualmente en el tratamiento de los tumores cerebrales, es la máxima resección quirúrgica, si ésta es posible llevarse a cabo³¹.

Como hemos señalado previamente, en la mayoría de los casos de gliomas de bajo grado, la resección completa es suficiente para su curación, pero en aquellos que debido a su localización anatómica no se puede llevar a cabo este procedimiento, o en los tumores de alto grado en los que la cirugía es insuficiente para su curación, son precisos tratamientos adicionales⁶¹.

Estos casos complejos son subsidiarios clásicamente de terapias adyuvantes como la quimioterapia y la radioterapia, con el riesgo de secuelas a largo plazo derivado de las mismas, hecho de especial relevancia en el caso de la radioterapia en pacientes de corta edad^{43,138}. Además, no son infrecuentes los casos de recidivas o progresiones tumorales, que a menudo, son de nuevo sometidas a repetidas resecciones quirúrgicas tanto como método de tratamiento, como de obtención de nuevo tejido tumoral para estudio, con la inevitable morbimortalidad añadida⁶¹.

Por todo ello, es evidente la relevancia de disponer de fármacos eficaces dirigidos a alteraciones moleculares específicas, que eviten estas terapias indiscriminadas, así como estrategias eficaces y menos invasivas para poder obtener esa información.

Basándonos en todas estas consideraciones, planteamos la siguiente **hipótesis de trabajo:**

Los marcadores predictivos de respuesta a tratamientos dirigidos y pronóstico en tumores cerebrales infantiles como las mutaciones BRAFV600E y H3K27M, actualmente sólo pueden identificarse a partir de muestras quirúrgicas de tejido tumoral. Sin embargo, debido a la localización

anatómica de algunos de estos tumores, la cirugía no constituye una opción de tratamiento o implica especial morbilidad, originando que se desconozcan las alteraciones moleculares o se disponga de una escasa muestra de tejido no representativa de la totalidad del tumor.

En este sentido, las células tumorales secretan material genético al espacio extracelular y desde ahí alcanza el torrente sanguíneo y otros biofluidos como el LCR, en donde se puede aislar y analizar.

Por tanto, la identificación y validación clínica de biomarcadores con potencial para ser utilizados en el manejo clínico de los pacientes pediátricos con tumores cerebrales, a partir de ADN circulante aislado en sangre periférica y LCR, permitiría disponer de un método mínimamente invasivo para evaluar el estado del tumor a tiempo real, aportando tanto información sobre la sensibilidad a fármacos concretos, como pronóstica.

La validación de esta técnica supondría paso decisivo en el manejo de estas patologías, con especial beneficio en la vulnerable población infantil.

Partiendo de esta hipótesis, se plantearon los objetivos desarrollados a continuación.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

El objetivo general del presente estudio es la utilización de ADN circulante libre procedente de suero, plasma y LCR de pacientes pediátricos con tumores cerebrales de difícil acceso y/o inoperables, para la identificación de alteraciones moleculares en genes relacionadas con la biología tumoral y con potencial para ser utilizadas en el manejo clínico de dichos pacientes.

2. Objetivos específicos

Uno de los principales desafíos a los que se enfrenta de forma global la validación de la aplicación de las biopsias líquidas, y al que por tanto nos hemos enfrentado en este estudio, es el de aumentar la sensibilidad de los métodos de detección de variantes alélicas de baja frecuencia. Con objeto de resolver estas dificultades mencionadas, se fijaron los siguientes objetivos que fueron llevándose a cabo de forma paralela a la recogida de muestras y su procesamiento:

1. Validación de técnicas de **aislamiento de ADN circulante** total a partir de muestras de plasma, suero y LCR.
2. Desarrollo de **técnicas de detección molecular**: Diseño de cebadores “primers” para amplificación mediante PCR convencional y sondas taqman específicas de mutación para dPCR.
El proyecto se centró en la identificación de las mutaciones BRAF V600E y H3K27M.
3. **Validación** de estas herramientas moleculares diseñadas para la detección de mutaciones, tanto en muestras de tejido sólido, como en biopsia líquida.

4. **Evaluación de la posibilidad de detectar mutaciones en el ADN circulante** aislado en el suero, plasma y LCR de pacientes pediátricos y adolescentes diagnosticados de tumores cerebrales de difícil acceso.
5. **Evaluación de la relevancia** de la identificación de mutaciones por biopsia líquida en la práctica clínica (respuesta al tratamiento y posterior seguimiento).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño de estudio

Como punto de partida, se realizó una **búsqueda bibliográfica** exhaustiva en la base de datos MEDLINE de tumores cerebrales, clasificación, biología, marcadores moleculares en tumores cerebrales de forma genérica, y de forma más exhaustiva en infantiles, diagnóstico, tratamiento, técnicas de biopsia líquida y su aplicación al campo de la oncología, y evolución en las técnicas de biología molecular aplicadas.

Esta búsqueda se fue actualizando y ampliando durante los años del proyecto de investigación (años 2015-2021).

En una primera fase del estudio, basándonos en la incidencia anual en España de tumores cerebrales en población pediátrica recogida en el Registro Español de Tumores Infantiles (RETI) de 216 casos en el año 2014, y en las estimaciones disponibles de casos de tumores inoperables de tronco, de aproximadamente unos 20-30 casos al año, **se generó el diseño de este estudio prospectivo.**

Se realizó un diseño de estudio con el objetivo de reclutar de forma prospectiva, en un periodo de 3 años, **30 pacientes pediátricos y del adolescente** diagnosticados de tumores cerebrales de difícil acceso y/o inoperables.

Dada la dificultad tanto de reclutar pacientes, se procedió a dar **difusión al proyecto de investigación** a través de la SEHOP, invitando a la participación de los facultativos responsables de las diferentes unidades.

A continuación, pasamos a desarrollar los métodos por los cuales se intentaron llevar a cabo los objetivos referidos en el apartado anterior.

2. Aprobación del estudio

Al tratarse de un proyecto de investigación basado en la recolección y estudio de muestras biológicas humanas, se realizó en el marco del respeto a los derechos y libertades fundamentales, con garantías de confidencialidad en el tratamiento de los datos de carácter personal y de las muestras biológicas (Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica).

Por tanto, se solicitó la aprobación de los comités éticos institucionales correspondientes de los hospitales, previamente a la realización del estudio, obteniéndose el informe favorable el 27 de Julio de 2016 (código CEIm HM Hospitales: 16.07.0974-GHM).

3. Selección de pacientes y obtención del consentimiento informado

La selección de los participantes en el estudio se basó en el diagnóstico de tumores cerebrales de difícil acceso y/o inoperables en edad pediátrica y adolescente. Este diagnóstico, fue realizado en cada hospital de origen por los especialistas en neurocirugía conjuntamente con los de oncología pediátrica, en base a criterios anatómicos detectados por imagen de resonancia magnética (RM). Posteriormente, se confirmó la naturaleza tumoral por estudio anatomopatológico, en aquellos en los que se logró llevar a cabo algún grado de resección tumoral.

Asimismo, se obtuvo en todos los casos el **consentimiento informado** de cada participante, tras la explicación de la naturaleza del estudio. Este consentimiento se obtuvo de los tutores legales en la mayoría de los casos, al tratarse de participantes menores de edad, o bien del propio paciente en mayores de 18 años. Se explicó el estudio y los procedimientos a llevar a cabo a los menores participantes, adecuando dicha información a su nivel de entendimiento, obteniendo su asentimiento siempre en los mayores de 12 años.

4. Obtención y recogida de las muestras

La recogida de muestras biológicas (sangre y LCR) se llevó a cabo desde el 1 de Julio de 2015 hasta el 31 de mayo de 2019.

Las muestras provenían de pacientes de servicios de Hematología y Oncología Pediátrica de los Hospitales HM Montepíncipe, Hospital Universitario Niño Jesús , Clínica Universitaria de Navarra y Hospital Clínico de Santiago.

Las muestras de sangre se obtuvieron a través de dispositivos implantables de carácter permanente tipo port-a-cath, en la mayoría de los casos, o mediante técnica de venopunción de una vena periférica por parte de personal de enfermería entrenada en dicho procedimiento. La obtención de estas muestras en los pacientes se hicieron coincidir con las extracciones de sangre programadas por parte de sus médicos responsables como parte del seguimiento clínico.

Se extrajeron de 3 a 5 ml de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA para la obtención posterior del plasma y otros 3-5 ml de sangre en un tubo con gel separador de suero, en cada extracción.

Las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) se recolectaron mediante punción lumbar, a través de drenajes externos, o por punción de reservorios de válvulas de derivación ventrículo-peritoneales por parte de los médicos responsables del paciente. Se extrajo un volumen de entre 1-5 ml de LCR, almacenándose en tubos secos, sin conservantes (**figura 12**).

Asimismo, destacamos que no se sometió al participante al procedimiento de extracción de LCR con el único objetivo de obtener muestra para el estudio, sino que se obtuvieron las muestras en el mismo acto indicado por su médico responsable, como parte del estudio, tratamiento y/o seguimiento de la enfermedad del paciente. Las principales indicaciones fueron estudio de extensión de su enfermedad de base o por el cribado, diagnóstico y/o seguimiento de sospechas de procesos infecciosos.

En la **figura 13** se muestra una representación general del origen y distribución del material presente en los biofluidos analizados y los métodos de extracción utilizados en nuestro estudio.

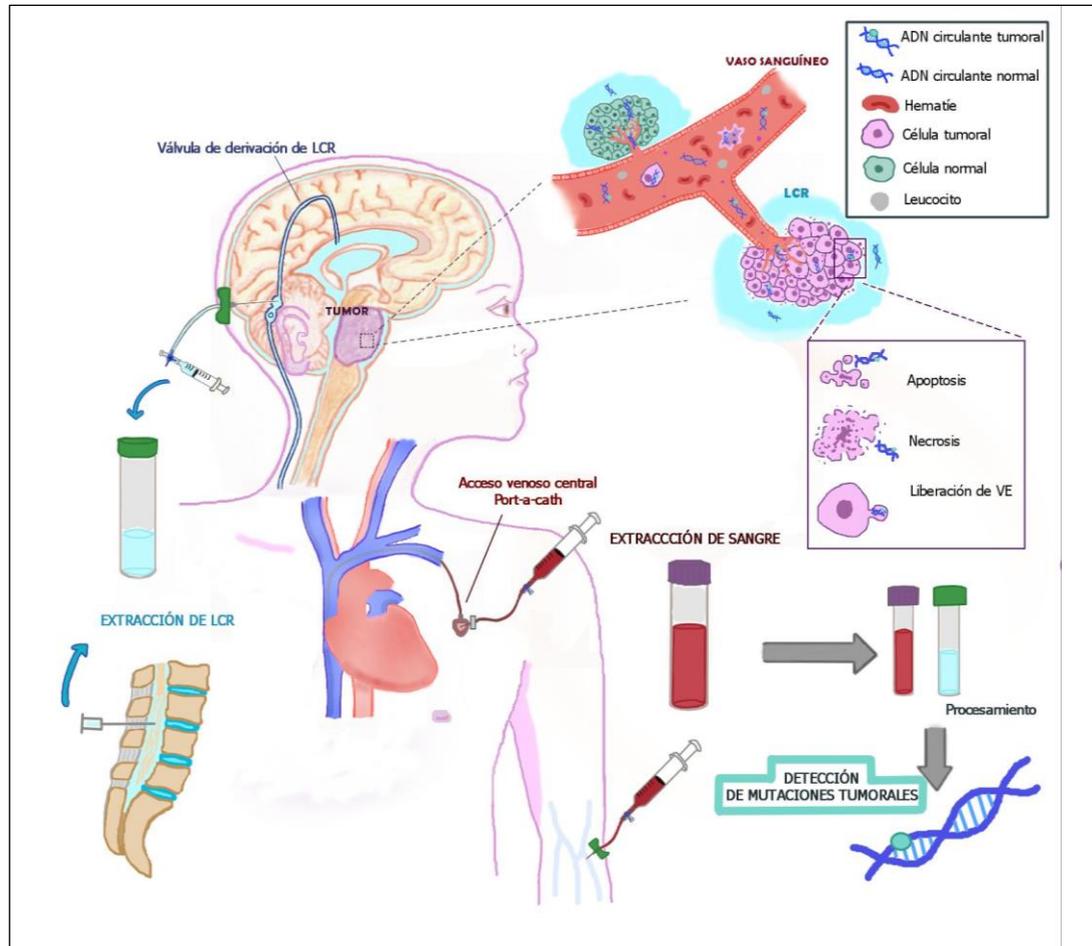
En cuanto a los tiempos de extracción de las muestra, se programó idealmente la recogida de las muestras al diagnóstico y tras los diferentes tratamientos recibidos, como cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, así como en el momento de progresión de la enfermedad.

Figura 12. Tubos de recolección de muestras.



De izquierda a derecha: Tubo de EDTA para aislamiento posterior de plasma, tubo sin anticoagulante para aislamiento posterior de suero y tubo seco para recogida de LCR.

Figura 13. Representación general del origen y distribución del material presente en los biofluidos analizados y los métodos de extracción utilizados en nuestro estudio.



Se representa un tumor cerebral de línea media, difícilmente accesible mediante cirugía. Las células tumorales liberan al torrente sanguíneo y al LCR material portador de mutaciones específicas, mezclándose con el resto de elementos circulantes. Esta liberación se produce mediante procesos de apoptosis, necrosis y secreción activa, El LCR se puede extraer a través de dispositivos de derivación o mediante punción lumbar, y la sangre se obtiene a través de dispositivos de acceso venoso central presentes en la mayoría de los pacientes de nuestro estudio, o bien mediante venopunción periférica. Posteriormente estas muestras son procesadas y sometidas a las técnicas de detección molecular.

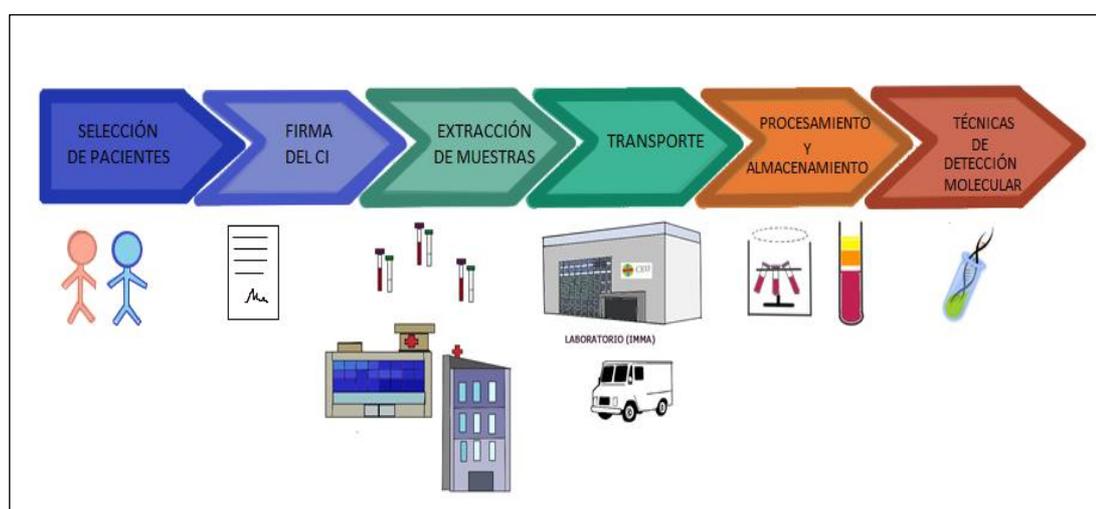
5. Envío de muestras y conservación

Todas las muestras se mantuvieron en refrigeración (2-6° C) desde su extracción, durante el transporte y hasta su procesamiento, realizado entre las 2 y 6 horas posteriores a la recolecta.

El procesamiento y almacenamiento se realizó en el laboratorio del Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA), en el campus de Montepíncipe de la Universidad CEU San Pablo, Urbanización Montepíncipe, 28925 Alcorcón (Madrid, España). En las muestras procedentes de fuera de Madrid, se procesaron en los laboratorios de sus hospitales de referencia, de forma previa a su envío.

Tanto las muestras como la información clínica de los participantes, se ha sometido a un proceso de anonimización desde el momento de su obtención.

Figura 14. Esquema del flujo de las muestras biológicas.



6. Procesamiento de muestras

6.1. Obtención del plasma y capa leucocitaria

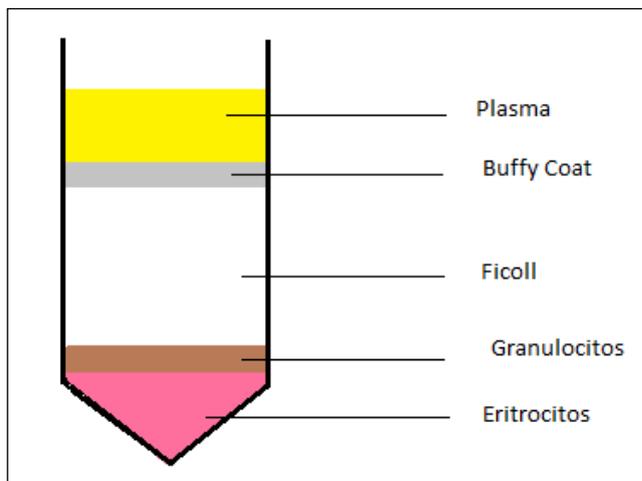
Para poder llevar a cabo este proceso se dispuso del siguiente material: Tubos de 1,5 y 15ml, pipetas serológicas de 5 y 10 ml, DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*) –Ca –Mg (Gibco), Ficoll (GE Healthcare, ref.17-1440-02) y una centrífuga para tubos de 1.5 y 15ml.

Se inicia el proceso invirtiendo el tubo de plasma (con anticoagulante) de 8 a 10 veces. Se centrifuga 10 minutos (min) a 1600 xg a 4°C, recogiendo el plasma (corresponde al líquido amarillo transparente en la parte superior) en un nuevo tubo y se vuelve a centrifugar 10 min a 3200 xg a 4°C, para eliminar posibles restos celulares. Se reparte el sobrenadante en alícuotas de 1 ml y se conservan a -80°C.

Además, se aisló la suspensión concentrada de leucocitos o el también denominado “*buffy coat*” a partir de las muestras de sangre, mediante el aislamiento por gradiente de Ficoll-Paque (**figura 15**), según el procedimiento descrito a continuación:

Tras haber centrifugado el plasma, se recoge la zona intermedia (capa leucocitaria), se lleva a un tubo de 15 ml limpio y se añade solución salina tamponada con fosfato DPBS hasta 4 ml. Estos 4 ml se vierten lentamente en un tubo de 15 ml preparado anteriormente con 3 ml de Ficoll en su interior, con una micropipeta de 1 ml, con cuidado de no mezclarlo con el Ficoll. Se centrifuga 30 min a 400 xg, sin freno, a 4°C. Se recoge el *buffy coat* en un tubo nuevo y se centrifuga a 2000 xg durante 5 min a 4°C. Finalmente se retira el sobrenadante al máximo posible y se congela con nitrógeno líquido, almacenándose a -80°C.

Figura 15. Esquema de gradiente de densidad con Ficoll-Paque.



6.2. Separación del suero

El material que se utilizó para llevar a cabo el proceso es el siguiente: Tubos de 1,5 y 15ml, pipetas serológicas de 5 y 10 ml y una centrífuga para tubos de 1,5 y 15 ml.

El proceso comienza dejando que la sangre coagule inicialmente durante un mínimo de 15-30 min. Posteriormente se centrifuga 10 min a 1600 xg y se recoge el suero pasándolo a un tubo nuevo. Se centrifuga 10 min a 3200 xg para eliminar restos celulares y se reparte el sobrenadante en alícuotas de 1 ml. Finalmente se conservan los tubos con el suero purificado a -80°C.

6.3. Procesamiento del líquido cefalorraquídeo

El material necesario para este paso es el siguiente: Tubos de 1,5 y 15 ml, pipetas serológicas de 5 ml y una centrífuga para tubos de 1,5 y 15 ml.

Se inicia el proceso centrifugando las muestras 10 min a 3000 xg para posteriormente recoger el sobrenadante en alícuotas de 1ml (o todo si es inferior a 1 ml) y se procede a su almacenaje a -80°C.

7. Aislamiento y cuantificación del ADN circulante

Se procedió a aislar y cuantificar ADN circulante derivado de plasma, suero y LCR con el kit de ácido nucleico circulante QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania), según el protocolo desarrollado a continuación, adaptación del fabricante.

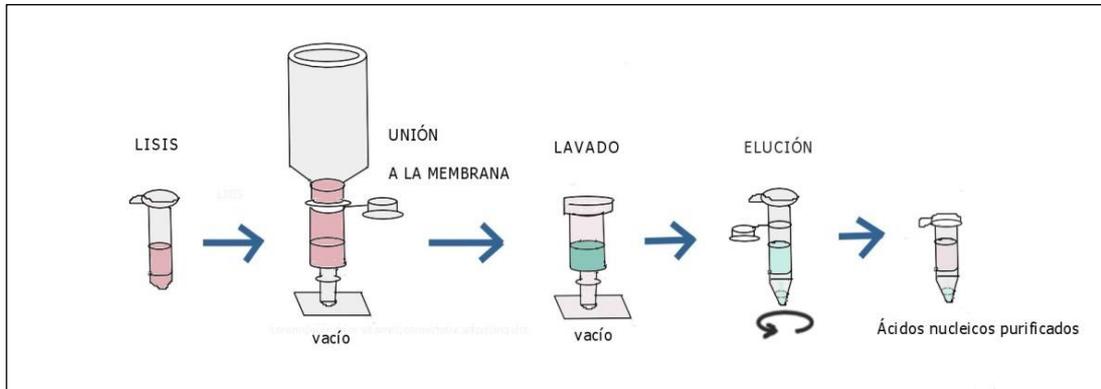
7.1. Aislamiento del ADN circulante

El objetivo del aislamiento de ADN es la purificación eficaz de los ácidos nucleicos circulantes. Los kits comerciales utilizados permiten concentrar ácidos nucleicos presentes en bajas concentraciones en volúmenes de elución de entre 20 y 150 μ l, eliminando proteínas, nucleasas y otras impurezas, a partir de volúmenes de muestra iniciales de hasta 5 ml. El ADN libre circulante obtenido tras este procedimiento está listo para su uso en otras técnicas o para su almacenamiento.

El material utilizado para llevar a cabo este proceso, es el detallado a continuación: Kit de ácido nucleico circulante QIAamp® (Qiagen, ref. 55114), colector de vacío QIAvac 24 plus (Qiagen, ref. 19413), colector VacValves (Qiagen, ref. 19408), bomba de vacío capaz de producir un vacío de -800 a -900 mbar, pipetas de desplazamiento positivo (Gilson, MICROMAN), pistones capilares estériles (Gilson), baño de agua o bloque calefactor para tubos de 15 ml a 60°C, bloque calefactor para tubos de 2 ml a 56°C, microcentrífuga, tubos de 15 ml, etanol 100%, isopropanol 100%, hielo picado, solución salina tamponada con fosfato y cabina de flujo laminar.

El procedimiento de aislamiento de los ácidos nucleicos consta de cuatro pasos fundamentales: lisis, unión, lavado y elución, llevándose a cabo con las columnas QIAamp Mini en el sistema QIAvac (figura 16).

Figura 16. Esquema de procedimiento de aislamiento de ADN circulante.



Basado en el protocolo del kit de ácido nucleico circulante QIAamp. Se representan los cuatro pasos fundamentales (lisis, unión a la membrana, lavado y elución) para obtener los ácidos nucleicos purificados listos para técnicas de detección molecular.

La lisis es un paso de carácter altamente desnaturalizante y tiene como objetivo la liberación de los ácidos nucleicos de su unión con proteínas, lípidos o vesículas y la inactivación de DNAsas y RNAsas circulantes. Para ello, inicialmente se pipetea 100 μ l de la *QIAGEN Proteinase K* en un tubo de 15 ml y se agrega 1 ml de la muestra de la cual queremos realizar la extracción de ADN. De esta mezcla, se agrega 1 ml a otro tubo de 15 ml. Posteriormente, se agrega 0,8 ml de tampón ACL a este tubo de 15 ml, se cierra la tapa y se mezcla agitando con vórtex durante 30 seg. Inmediatamente después, se incuba el producto a 60°C durante 30 min.

El segundo paso es la **unión a la membrana** cuyo objetivo es conseguir la adhesión de los ácidos nucleicos libres obtenidos en el paso anterior a una membrana de sílice, que se realizará mediante un colector de vacío. Para permitir una adsorción óptima de los ácidos nucleicos circulantes con la membrana de la columna QIAamp Mini, se ajustan las condiciones para la misma mediante la adición de Buffer ACB (1,8 ml) al lisado una vez finalizada la incubación, mezclando bien con vórtex durante 15-30 seg, para

después incubar el tubo durante 5 min en hielo. Posteriormente se inserta firmemente la columna QIAampMini con el colector de vacío (*VacConnector del QIAvac 24 Plus*) y se inserta un extensor de tubo de 20 ml en la columna QIAamp Mini abierta. A continuación, se aplica cuidadosamente la mezcla de lisado-tampón ACB en el extensor de tubo, y se procede a encender la bomba de vacío. Una vez que todos los lisados hayan atravesado completamente las columnas, se apaga la bomba de vacío y se libera la presión a 0 mbar, retirando y desechando cuidadosamente el prolongador de tubo.

El tercer paso es el **lavado**, que elimina los contaminantes residuales manteniendo los ácidos nucleicos unidos a la membrana. Esto se lleva a cabo mediante tres lavados sucesivos con aplicaciones de vacío. El primero con 600 µl de tampón ACW1, el segundo con 750 µl de tampón ACW2 y el tercero con 750 µl de etanol al 100%.

El cuarto y último paso es la **elución de los ácidos nucleicos**: El objetivo es la separación de los ácidos nucleicos de la membrana utilizando un Buffer (AVE). Para ello, se cierra la tapa de la columna y se coloca en el tubo de recogida. Se centrifuga a máxima velocidad (16.000 xg; 13.200 rpm) durante 3 min. Se coloca la columna en un tubo colector nuevo de 2 ml. Se abre la tapa y se incuba a 56°C durante 10 min. Se coloca la columna en un tubo limpio de 1,5 ml y se aplica cuidadosamente un volumen de elución flexible de entre 20-150 µl de tampón AVE en el centro de la membrana. Se cierra la tapa de nuevo y se incuba a temperatura ambiente durante 3 minutos para posteriormente centrifugar a máxima velocidad durante 1 min, obteniéndose de esta forma el eluido final de ácidos nucleicos purificados.

Es importante destacar que todo el procedimiento se debe llevar a cabo en una cabina de flujo laminar y que todos los pasos de centrifugación se realizan a temperatura ambiente (15-25 ° C).

7.2. Cuantificación del ADN circulante

Posteriormente, se determinó la concentración de ADN purificado obtenido utilizando el kit de ensayo *QubitTM dsDNA High Sensitivity* en un fluorómetro QubitTM 3.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), según el protocolo detallado a continuación, adaptación del fabricante:

La determinación de la concentración de ácidos nucleicos mediante fluorimetría, se basa en la unión de fluorocromos al ADN. Estos agentes producen fluorescencia cuando se unen al ADN, que puede ser cuantificada. Utilizando una concentración específica del tinte fluorescente, la intensidad de la señal de fluorescencia de la mezcla es directamente proporcional a su concentración de ADN.

El fluorómetro Qubit recoge esta señal de fluorescencia y la convierte en una medida de concentración de ADN haciendo referencia a sondas de ADN de concentración conocida (estándares). Posteriormente calcula la concentración de ADN de la muestra a estudio basándose en esta relación.

El material necesario para llevar a cabo este proceso es el detallado a continuación: Fluorómetro QubitTM 3 (Thermo Scientific, ref Q33216), kit de ensayo QubitTM dsDNA HS (Thermo Scientific, ref. Q32851), tubos de ensayo QubitTM (Thermo Scientific, ref. Q32856), pipetas de desplazamiento positivo (Gilson, MICROMAN) y pistones capilares estériles (Gilson) y cabina de flujo laminar solo para la manipulación de muestras de ADN.

Se inicia el procedimiento preparando el número necesario de tubos de 0,5 ml para muestras y estándares etiquetando adecuadamente las tapas.

A continuación, preparamos suficiente solución de trabajo Qubit® diluyendo el reactivo Qubit® dsDNA HS 1: 200 en Qubit® dsDNA HS Buffer, que se añadirá a los tubos de los estándares y de las muestras. Ya que el volumen final en cada tubo debe ser de 200 µL, cada tubo estándar requiere 190 µL de solución de trabajo Qubit® y 10 µl de cada estándar Qubit®, y cada tubo de muestra requiere entre 180 y 199 µL (se prueba inicialmente con 198 µl

para 2 µl de muestra, ajustando el volumen de la muestra si las lecturas salen de rango).

Se agita cada tubo de estándares y de muestras en vórtex de 2 a 3 seg, con cuidado de no crear burbujas y se deja que todos los tubos se incuben a temperatura ambiente durante 2 min.

A continuación, se procede a la lectura en el fluorómetro Qubit® 3.0, seleccionando como tipo de ensayo la opción de *dsDNA High Sensitivity*. Se realiza la lectura de estándares insertando inicialmente el tubo que contiene el estándar n. ° 1 en la cámara de muestras. Una vez finalizada esta lectura, retiramos el estándar n. ° 1 y se procede a la lectura del estándar n. ° 2. A continuación, se inicia la ejecución de la lectura de las muestras, seleccionando inicialmente el volumen y las unidades de la muestra (2 ul; ng / ul). Posteriormente se realiza la lectura de todos los tubos de muestras insertándolos en la cámara de muestras. Una vez que las lecturas estén completas, se exportan los datos.

Es importante destacar que, los diferentes pasos del proceso de cuantificación, se pueden realizar en la mesa de laboratorio hasta que se agregue la muestra de ADN a la mezcla de cuantificación. Este último paso se llevará a cabo en una cabina de flujo laminar.

8. Obtención del ADN de línea germinal

Se utilizó el kit *DNeasy Blood and Tissue (Qiagen)* para obtener ADN de la línea germinal a partir de la suspensión concentrada de leucocitos o el también denominado “*buffy coat*”, aislada a partir de las muestras de sangre. Para poder llevar a cabo este proceso se dispuso del siguiente material: *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, ref. 69504), RNAsa A (Sigma, ref. R6513), alcohol etílico absoluto, tubos de 1,5 ml, puntas con filtro, micropipetas, termobloque y una microcentrífuga.

Se inicia el proceso con la centrifugación de las células a 2000 xg durante 5 min, tras lo cual se retira el sobrenadante y se añaden 200 µl de PBS. Posteriormente se añade 20 µl de proteinasa K y 4µl de RNasa A (100mg/ml) y se mezcla. Se incuba 2 min a temperatura ambiente.

A continuación se añaden 200 µl de buffer AL y se mezcla con vórtex. Se incuba a 56°C durante 10 min. Después se añaden 200µl de alcohol 100% y se mezcla. De esta mezcla se pipetea los 620 µl en la columna de purificación y se centrifuga 1min a 8000 rpm. Se retira el eluido, se añaden 500 µl de buffer AW1 y se centrifuga 1 min a 8000 rpm. Se retira el eluido y se añaden 500µl de buffer AW2 centrifugándose 3 min a 14000 rpm. Se retira de nuevo el eluido. Se reemplaza el tubo de 2 ml por uno de 1,5 ml, se añaden 200µl de buffer AE, se incuba 1 min a temperatura ambiente y por último se centrifuga 1 min a 8000 rpm. Como paso final se mide la concentración.

9. PCR digital

La dPCR se realizó de forma automatizada de acuerdo con el protocolo de referencia para mutaciones raras, utilizando el sistema QuantStudio™ de PCR digital 3D (ThermoFisher Scientific).

Se procedió a obtener la sonda para la mutación V600E de *BRAF* prediseñada por Thermo Fisher Scientific (ID: AH6R5PH) y se diseñaron sondas para la mutación K27M de *H3F3* y la K27M de *HIST1H3B*.

A continuación se describen las secuencias de las sondas empleadas:

Secuencia de sonda **mutación V600E de *BRAF***:

ATGGGACCCACTCCATCGAGATTTTC[A/T]CTGTAGCTAGACCAAATCAC
CTAT.

Secuencia de la sonda para la **mutación K27M de *H3F3***:

TCAATGCTGGTAGGTAAGTAAGGAGGTCTCTGTACCATGGCTCGTACAA
AGCAGACTGCCCGCAAATCGACCGGTGGTAAAGCACCCAGGAAGCAAC
TGGCTACAAAAGCCGCTCGCA[A>T]GAGTGCGCCCTCTACTGGAGGGG
TGAAGAAACCTCATCGT.

Secuencia de la sonda para la **mutación K27M de HIST1H3**:

TGGCTCGTACTAAACAGACAGCTCGGAAATCCACCGGCGGTAAAGCGC
CACGCAAGCAGCTGGCTACCAAGGCTGCTCGCA[A>T]GAGCGCGCCGG
CTACCGGCGGCGTGAAAAAGCCTCACCGTTACCGCCCGGGCACTGTGG
CTCTGCGCGAGATCCGCCGCTACCAA

El paso fundamental en la técnica de dPCR, es el proceso de cargado de cada *chip* para cada muestra, con un volumen final 15 µl en cada uno de ellos, con un máximo de 24 *chips* en cada serie. En cada *chip* tienen lugar 20.000 reacciones.

Se combinó 1,5 µl de ADN circulante aislado de las muestras seleccionadas con 5,25 µl de agua libre de nucleasas, 7,5 µl la mezcla maestra QuantStudio de PCR digital 3D y 0,75 µl de las sondas TaqMan.

Se carga cada chip con los 14,5 µl de la mezcla y se completa con el líquido de inmersión, rotulando posteriormente cada chip correctamente.

Se utilizó el termociclador 9700, cuyas condiciones térmicas del programa fueron de 10 min a 96°C en la activación de la polimerasa, 39 ciclos de 2 min a 60°C y 30 seg a 98°C, con extensión final de 2 minutos a 60°C, con una duración total de 2 horas y 50 min.

Se analizaron los resultados con QuantStudio™ 3D Analysis Suite Cloud Software (ThermoFisher Scientific) y se calculó el número medio de copias por microL.

10. PCR convencional

Para los ensayos de PCR convencionales, el ADN genómico (ADNg) se amplificó utilizando las siguientes secuencias de nucleótidos de los cebadores (*primers*) para las diferentes mutaciones:

Mutación V600E de BRAF: Fw (*Forward*): 5´CATGAAGACCTCACAGTAAA 3´ y Rv (*Reverse*):5´AGACAACTGTTCAA ACT GAT 3´.

Mutación K27M de HIST1H3B: Fw:5´TGGCTCGTACTAAACAGACAGC3´ y Rv:5´TTGGTAGCGGCGGATCTC3´.

Mutación K27M de *H3F3A*: Fw: 5'TCAATGCTGGTAGGTAAGTAAGGA 3' y Rv: 5'GGTTTC TTCACCCCTCCAG 3'.

Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo el protocolo de la enzima Paq5000 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU). Las condiciones térmicas del ciclo consistieron en un paso de desnaturalización de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 20 seg, 53,5 °C durante 20 seg y 72°C durante 30 seg.

Los productos finales de PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1,8%.

11. Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se realizaron con el kit de secuenciación por ciclos *BigDye® Terminator v3.1* (ThermoFisher Scientific). La electroforesis capilar se realizó en el analizador genético de ADN 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Los productos de la reacción de secuenciación se analizaron con el Software de análisis de secuenciación (Applied Biosystems) y alineado mediante el algoritmo del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

12. Cálculos estadísticos

Para poder definir con fiabilidad el estado mutacional de *BRAF* a partir de nuestro análisis con dPCR de las muestras de biopsia líquida, bien como mutado, o bien como “wild type” (WT), se procedió a realizar un análisis estadístico basado en la **distribución de probabilidad de Poisson**, para sucesos “discretos” (en el presente estudio corresponde al número de nanogotas que ofrecen un resultado positivo en la dPCR) y “raros”, es decir, con probabilidades muy pequeñas de producirse (en el presente estudio se obtiene un bajo número de falsos positivos (FP) en comparación al número de gotas analizadas en una misma muestra).

Inicialmente se determinó los esperados FP para cada muestra a partir del número de FP de nuestro estudio usando controles negativos.

La media de FP fue de 3,25 resultados mutados por 16,878 resultados WT, con lo que se calculó el ratio de falsos positivos (R_{FP}). Esta relación se utilizó para obtener el promedio de falsos positivos, Λ_{FP} , esperados para cada muestra.

Esta media corresponde al parámetro lambda (λ) que define la distribución de Poisson. Mediante esta distribución de Poisson con media Λ_{FP} , se obtuvo la significación de los resultados positivos para cada muestra. Es decir, nos indica la probabilidad de que, por azar, obtengamos mayor o menor número de falsos positivos que exactamente la media. De esta manera se puede cuantificar las fluctuaciones debidas al azar.

Se calculó para ello cada valor de “p” como propone Milbury et al¹³⁹¹³⁹ (**figura 17**) usando un umbral de confianza del 95% para rechazar la hipótesis nula (H_0) de que la muestra es WT, es decir, que obteniendo un valor de $p < 0,05$ rechazamos la H_0 , y por tanto, definimos el estado mutacional de la muestra como mutado, con una probabilidad de error del 5%.

Figura 17. Ecuación de Excel para calcular el p-valor según la distribución de Poisson. (POISSON.DIST).

p value = 1 - POISSON.DIST (NMut - 1, Λ_{FP} , TRUE)

Extraído de Milbury CA et al. *Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. Biomol Detect Quantif.* 2014;1(1):8-22¹³⁹.

13. Creación de la base de datos

Se crearon dos bases de datos en la hoja de cálculo Microsoft Excel, una con las características clínicas de los pacientes y otra con los datos analíticos de laboratorio.

En el **registro con los datos clínicos** de cada participante, se incluyeron las siguientes variables: sexo, edad, diagnóstico anatomopatológico, fecha de diagnóstico, obtención de biopsia sólida, estudios moleculares realizados en dicha muestra sólida, tratamientos recibidos y evolución clínica, así como de las diferentes muestras de biopsia líquida extraídas en cada uno de ellos y fecha de recogida.

En el **registro de datos analíticos de laboratorio**, se incluyeron las características de las extracciones del material genético circulante, las herramientas moleculares aplicadas en su estudio y los resultados obtenidos.

RESULTADOS

1. Descripción de la muestra

1.1. Cohorte inicial:

Desde el 1 de Julio de 2015 hasta el 31 de mayo de 2019, **un total de 38 pacientes pediátricos y adolescentes** diagnosticados de tumores del SNC de difícil acceso anatómico y/o inoperables fueron incluidos en el estudio tras la firma del consentimiento informado (tabla 4).

El rango de edad de esta cohorte inicial era de 1 a 21 años de edad, con una media de 10,05 años. En cuanto a la distribución por sexo, 24 de los pacientes eran varones (63%) y 14 mujeres (37%)

Las muestras provenían de pacientes de servicios de Hematología y Oncología Pediátrica de diferentes hospitales, en su mayoría del Hospital Universitario HM Montepríncipe (29 pacientes), Hospital Universitario Niño Jesús (7 pacientes), Clínica Universitaria de Navarra (1 paciente) y Hospital Clínico Santiago (1 paciente).

Todos los pacientes incluidos habían sido diagnosticados de tumores cerebrales de difícil acceso anatómico y/o inoperables, siendo el criterio anatómico predominante para esta denominación el de localizarse a nivel de la línea media (diencéfalo, tronco y vermis cerebeloso).

En esta cohorte inicial, los **tumores de origen glial** fueron los más predominantes, constituyendo 26 de los 38 casos **(68,4%) (figura 18)**.

Entre ellos, los más frecuentes (55% del total de gliomas) fueron los **gliomas de alto grado** (21 casos), clasificándose 17 de ellos como gliomas difusos de la línea media y 4 como glioblastomas. Entre estos últimos, 12 con diagnóstico específico de glioma difuso de protuberancia (5 de ellos con

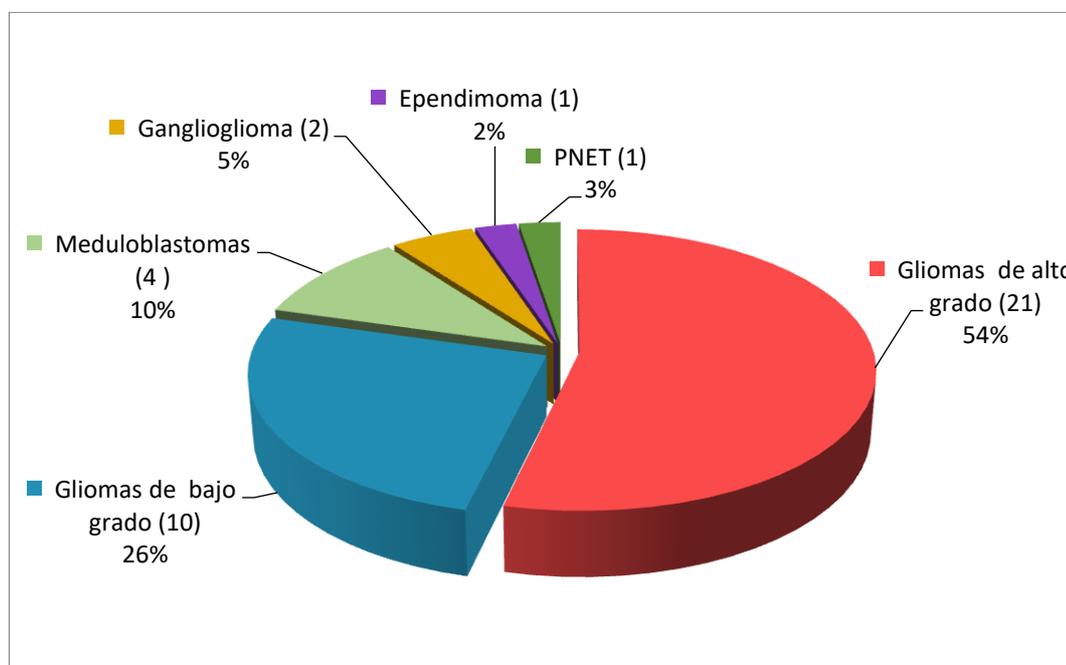
la mutación H3K27M mutada) y 4 gliomas difusos de línea media con H3K27M mutado, considerándose grado IV de la OMS por este hecho.

Los **gliomas de bajo grado** representaron el 26% del total de tumores (10 casos) y el 38,5% de los tumores de origen glial, dividiéndose en los siguientes diferentes subtipos: 4 astrocitomas pilocíticos, 2 astrocitomas pilomixoides, 2 astrocitomas difusos, uno de ellos con mutación V600E de BRAF, 1 xantastrocitoma pleomórfico con mutación V600E y 1 oligodendroglioma.

Los **meduloblastomas** representaron el 10,5 % de los casos (4 pacientes), uno de ellos clasificado como grupo molecular SHH y tres como grupos moleculares 3 o 4.

El otro 10,5% restante de los casos de nuestra cohorte inicial correspondían a 2 **gangliogliomas** (tumores mixtos neuro-gliales), un tumor neuroectodérmico primitivo (**PNET**) y un **ependimoma**.

Figura 18. Distribución en frecuencia de tipos tumorales de muestra inicial (N=38).



Dada la complejidad de las características clínicas de los participantes, las diferentes localizaciones geográficas y la dificultad en la recogida de muestras, la cronología en la recogida de muestras de cada pacientes prevista en el diseño inicial del estudio, no ha podido realizarse en la mayoría de los casos y es ampliamente heterogénea

1.2. Cohorte definitiva a estudio:

Tras los ensayos iniciales y la evaluación de las muestras disponibles a estudio, se seleccionó una cohorte de 29 pacientes entre los 38 iniciales. En esta cohorte definitiva a estudio, la recogida de las muestras de tejido sólido, en aquellos casos en que estuviese disponible, y la recogida de muestras líquidas, se hicieron de forma simultánea, evitando así el sesgo de temporalidad en el posterior análisis de concordancia.

A continuación, se resumen las características del total de pacientes, resaltándose los pacientes seleccionados para para la cohorte definitiva (tabla 4).

Tabla 4. Cohorte de pacientes con sus características clínicas N=38 (en amarillo cohorte definitiva N=29)

PACIENTE	EDAD (años)	DIAGNÓSTICO	LOCALIZACIÓN	ALTERACIONES MOLECULARES
LI.01	10	DIPG	Protuberancia	H3K27M+
LI.02	14	Glioblastoma	Hemisferio cerebral izdo	Amplificación N-MYC, ATRX +
LI.03	5	Meduloblastoma Grupo SHH	Vermis cerebeloso	Mutación exón 20 del gen PTCH1
LI.04	7	Meduloblastoma Grupo 3 o 4	Hemisferio cerebeloso izdo y vermis	Reordenamiento de BCRA2 en el intron 2 BRAFV600E-
LI.05	14	Meduloblastoma Grupo 3 o 4	Fosa posterior*	BRAFV600E -
LI.06	17	Glioma difuso línea media	Tálamo, mesencéfalo y pedúnculo izdo	H3K27M+ BRAFV600E-
LI.10	3	Glioma difuso línea media	Tálamo	H3K27M- BRAFV600E-
LI.11	17	Astrocitoma pilocítico	Diencéfalo	BRAFV600E- Fusión KIAA1549- BRAFV600E-
LI.13	6	Ganglioglioma	Fosa posterior*	BRAFV600E-
LI.15	7	DIPG	Protuberancia	H3K27M- BRAFV600E-

PACIENTE	EDAD (años)	DIAGNÓSTICO	LOCALIZACIÓN	ALTERACIONES MOLECULARES
LI.16	12	Glioblastoma	Lóbulo temporal	H3K27M+
LI.17	6	Ependimoma anaplásico	Fosa posterior*	No detectadas
LI.18	15	DIPG	Protuberancia	No biopsiado
LI.19	7	Glioma difuso línea media	Tálamo	BRAFV600E+ H3K27M-
LI.20	8	DIPG	Protuberancia	No biopsiado
LI.21	6	Glioma difuso de línea media	Tálamo y pedúnculo dcho	H3K27M+
LI.22	2	Astrocitoma pilomixóide	Hemisferio cerebral izdo y tálamo	BRAFV600E- H3K27M-
LI.23	8	DIPG	Protuberancia	No biopsiado
LI.25	8	Xantastrocitoma pleomórfico	Lóbulo temporal izdo	BRAFV600E+
LI.26	15	Oligodendroglioma	Fosa posterior*	Deleción de 19q, sin deleción de 1p
LI.27	19	DIPG	Protuberancia	H3K27M+
LI.28	7	DIPG	Protuberancia	No biopsiado
LI.29	9	DIPG	Protuberancia	No biopsiado
LI.30	12	Glioma difuso línea media	Tálamo	H3K27M+
LI.31	2	Ganglioglioma anaplásico	Fosa posterior*	BRAFV600E+
LI.32	8	DIPG	Protuberancia	No biopsiado
LI.33	10	DIPG	Protuberancia	No biopsiado
LI.34	4	DIPG	Protuberancia	H3K27M+
LI.35	6	DIPG	Protuberancia	H3K27M+
LI.36	6	Astrocitoma pilomixóide	Talámico izdo	BRAFV600E+
LI.37	18	Meduloblastoma Grupo 3 o 4	Fosa posterior*	No detectadas
LI.38	11	Astrocitoma pilocítico	Fosa posterior*	BRAFV600E+
LI.39	3	PNET	Hemisférico dcho	Mutación BCOR
LI.40	15	Astrocitoma pilocítico	Fosa posterior*	Desconocido
LI.41	14	Glioblastoma	Frontotemporal izdo	H3K27M+ BRAFV600E-
LI.42	1	Glioblastoma	Lóbulo frontal dcho	Gen de fusión ROS1-HNRNP H3K27M- BRAFV600E-
LI.43	12	Glioma difuso línea media	Vermis y pedúnculo cerebeloso	H3K27M+ BRAFV600E-
LI.44	21	Astrocitoma pilocítico	Fosa posterior*	No detectadas

*La fosa craneal posterior alberga cerebelo y protuberancia. Las mutaciones seguidas del símbolo "+" indican que se detectaron en la muestra sólida del tumor correspondiente. El símbolo "-" indica que la muestra sólida del tumor resultó WT para la mutación.

En esta cohorte definitiva a estudio, los **tumores de origen glial** seguían siendo los más frecuentes (23 casos que representa el 79,3% del total) y entre ellos los de **alto grado** constituían el subgrupo más prevalente (48%, correspondiente a 14 casos).

Dentro de estos gliomas de alto grado, 2 casos correspondían a glioblastomas y 12 casos a gliomas difusos de la línea media (41,4 %). Entre estos últimos, 8 con diagnóstico específico de glioma difuso de protuberancia (4 de ellos con la mutación H3K27M mutada, en los otros 4 casos no se disponía de biopsia) y 4 gliomas difusos de línea media con H3K27M mutado, considerándose grado IV por este hecho.

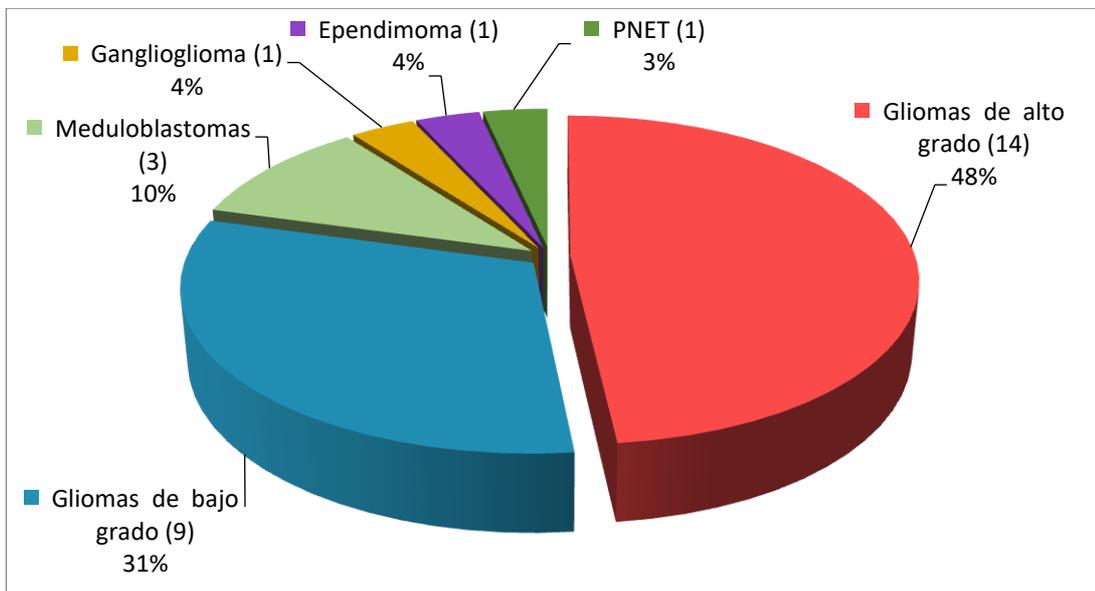
Los **gliomas de bajo grado** representaban el 31% del total de tumores (9 casos), entre los cuales se describían los siguientes subtipos: 4 casos de astrocitomas pilocíticos (1 con mutación V600), 2 astrocitomas pilomixoides (1 con mutación V600), 1 astrocitoma difuso, 1 xantoastrocitoma pleomórfico con mutación V600E y 1 oligodendroglioma.

Los **meduloblastomas** representaban el 10,3% de los casos (uno clasificado como grupo molecular SHH y los otros dos como grupo molecular 3 o 4). El 10,3% restante correspondía a un **ganglioglioma**, un **PNET** y un **ependimoma (figura 19)**.

La **localización predominante** fue la línea media (62%), entre los cuales 8 casos correspondían a protuberancia, 7 casos a diencéfalo (tálamo) y 3 a vermis cerebeloso.

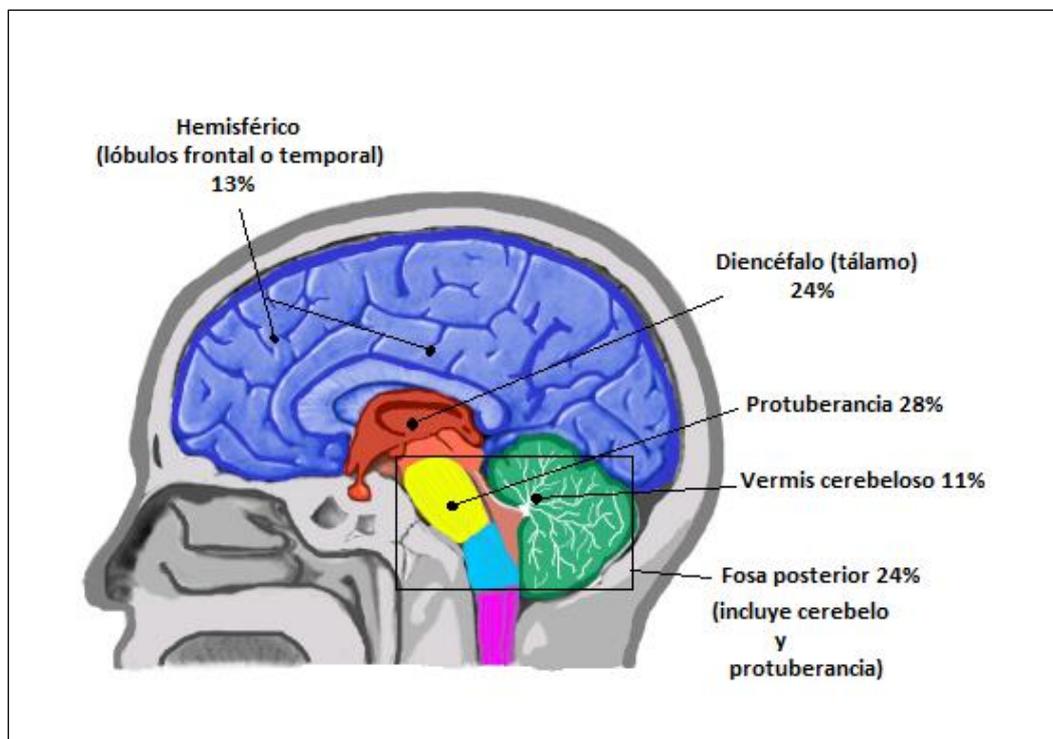
Siete de los pacientes presentaban tumores en fosa posterior (espacio anatómico que incluye protuberancia y cerebelo) representando el 24% de los pacientes. Los otros 4 pacientes restantes presentaban tumores hemisféricos (**figura 20**).

Figura 19. Distribución de los tipos tumorales en la muestra definitiva a estudio.



La frecuencia de cada tipo tumoral se expresa en número de pacientes y porcentaje del total (N=29)

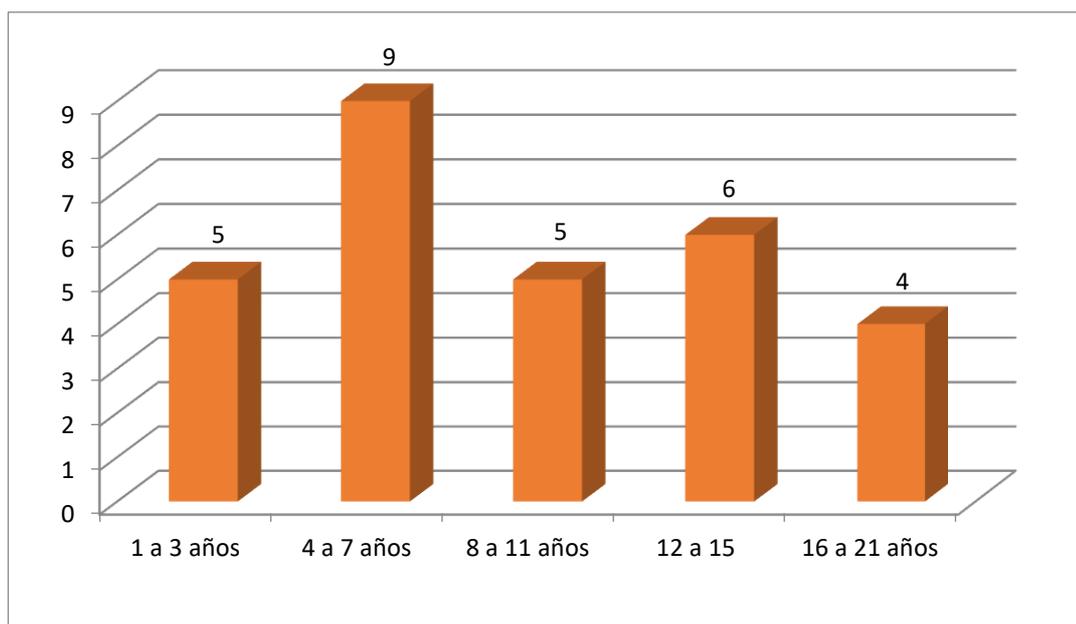
Figura 20. Distribución de los tumores en cuanto a localización anatómica.



En cuanto a la edad de los pacientes, la media fue de 9,2 años, con un rango entre 1 y 21 años. El rango de edad más prevalente fue el de 4 a 7 años (**figura 21**).

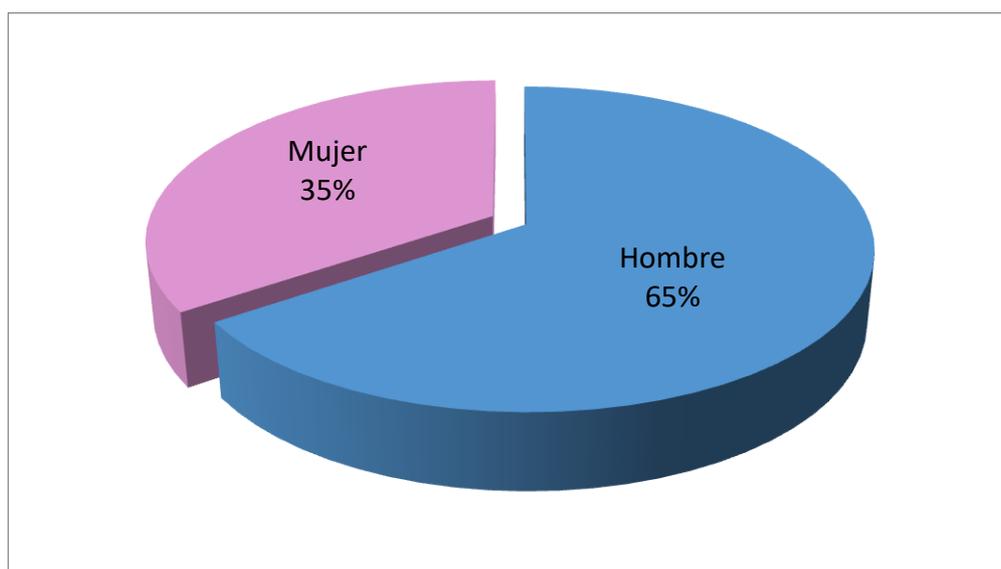
En cuanto a la distribución por sexo, predominó el sexo masculino con un 65,5% (19 pacientes fueron hombres y 10 mujeres) (**figura 22**).

Figura 21. Distribución de los pacientes por rangos de edades.



La frecuencia de cada rango de edad se expresa en número de pacientes (N total=29)

Figura 22: Distribución de los pacientes por sexo



2. Validación de técnicas de aislamiento de ADN circulante a partir de las muestras de biopsia líquida

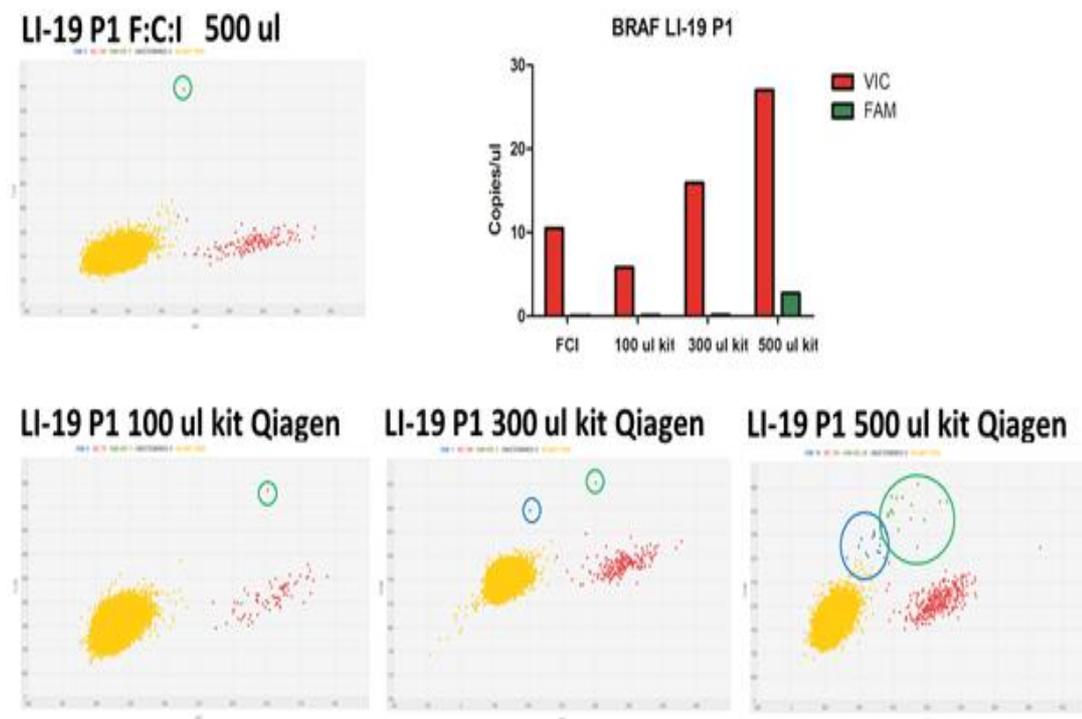
Inicialmente, se realizó una **comparación de dos métodos de aislamiento de ADN** circulante en cuanto a la capacidad que ofrecían en el producto aislado para la detección de la mutación V600E del gen *BRAF* mediante dPCR. La sonda comercial ya se había validado previamente en tejido sólido como se desarrolla en el apartado 5.5.1.

Para ello, se comparó la extracción de ADN del plasma del paciente L.I.19, diagnosticado de un astrocitoma difuso de línea media portador de la mutación BRAFV600E, mediante la técnica de Fenol:Cloroformo:Isoamilalcohol (F:Cl:I) y mediante el kit comercial QiaAmp Circulating Nucleic Acids de Qiagen.

Con el kit de Qiagen se obtuvieron los mismos resultados partiendo de un volumen inicial de muestra de plasma de 100 μ l que con la técnica de F:Cl:I con un volumen mayor, de 500 μ l, por lo que se consideró una técnica con mayor eficiencia

Con este último kit, se probaron también diferentes volúmenes de partida de la muestra, resultando 300 μ l el volumen mínimo para detectar posteriormente el alelo mutado mediante dPCR (**figura 23**).

Figura 23. Detección mediante dPCR de la mutación BRAFV600E comparando dos métodos de extracción de ADN circulante (F:Cl:I y Kit de Qiagen) y diferentes volúmenes de muestra de plasma de partida.



Con el kit de Qiagen se obtienen los mismos resultados partiendo de un volumen inicial de muestra de plasma de 100 μ l que con la técnica de F:Cl:I con un volumen mayor, de 500 μ l. A continuación, se prueba la capacidad de detección del alelo mutado partiendo de ADN circulante obtenido mediante el kit de Qiagen a partir de volúmenes menores de plasma, resultando 300 μ l el volumen mínimo para empezar a detectarse varias copias del alelo mutado (señales FAM detectadas en color verde)

3. Aislamiento de ADN circulante en las muestras de biopsia líquida

Posteriormente, **se procedió al aislamiento del ADN de manera sistemática** mediante el kit comercial QiaAmp Circulating Nucleic Acids de Qiagen en las muestras de biopsia líquida de nuestra cohorte.

A continuación, se describe detalladamente (**tabla 5**), las características de las muestras obtenidas en cada uno de los 38 pacientes de la cohorte inicial, el volumen inicial obtenido, así como los datos referentes a la extracción de ADN en cada una de las muestras de suero, plasma y LCR (volumen final y

concentración obtenida expresada en ng/microLitro), resaltando los pacientes y sus muestras correspondientes utilizadas en el estudio final (N=29).

Tabla 5. Total de muestras obtenidas de cada paciente y extracción de ADN circulante realizada en cada una de ellas (N=38).

ID	DATOS MUESTRA			EXTRACCIÓN DNA CIRCULANTE	
	TIPO DE MUESTRA	MUESTRA	Vi	Vf	ng/μl
LI.01	LCR	L.I.-01.LCR1	2ml	25μl	0,261
	Suero	L.I.-01.S1	4ml	25 μl	0,72
	Suero	L.I.-01.S2	6ml	25 μl	2,13
	Suero	L.I.-01.S3	<4ml	25 μl	4,62
LI.02	Suero	L.I.-02.S1	6ml	25 μl	14,5
LI.04	Suero	L.I.-04.S1	3ml	25 μl	0,74
	Suero	L.I.-04.S4	500 μl	55 μl	2,16
	Plasma	L.I.-04.P1	500 μl	55 μl	2,26
	LCR	L.I.-04.LCR1	500 μl	55 μl	2,08
LI.03	LCR	L.I.-03.LCR1	420 μl	50 μl	0,592
	LCR	L.I.-03.LCR2	300 μl	50 μl	0,0624
	LCR	L.I.-03.LCR3	850 μl	50 μl	0,839
	Plasma	L.I.-03.P1	870 μl	40 μl	0,365
	Suero	L.I.-03.S2	1,89ml	60 μl	1,61
LI.05	LCR	L.I.-05.LCR1	1,65ml	60 μl	0,228
LI.06	LCR	L.I.-06.LCR1	100ul	25 μl	0,171
	Plasma	L.I.-06.P3	1,3ml	50 μl	1,94
	Suero	L.I.-06.S5	1,3ml	60 μl	46,3
LI.10	LCR	L.I.-10.LCR1	800ul	50 μl	0,101
	Plasma	L.I.-10.P2	1,1ml	50 μl	0,4
	Suero	L.I.-10.S2	1,6ml	60 μl	5,65
LI.11	LCR	L.I.-11.LCR1	2,5ml	80 μl	1,48
	Plasma	L.I.-11.P3	1,3ml	50 μl	0,767
	Suero	L.I.-11.S3	1,85ml	60 μl	14,6
LI.13	Plasma	L.I.-13.P1	500 μl	55 μl	2,54
LI.15	Suero	L.I.-15.S3	500 μl	55 μl	10,5
	Plasma	L.I.-15.P3	500 μl	55 μl	4,41
LI.16	Plasma	L.I.-16.P1	500 μl	55 μl	2,61
LI.17	Suero	L.I.-17.S2	500 μl	55 μl	55
	Plasma	L.I.-17.P2	500 μl	55 μl	39,9
LI.18	LCR	L.I.-18.LCR1	890 μl	50 μl	0,111
	Plasma	L.I.-18.P1	1,95ml	50 μl	0,456
LI.19	Plasma	L.I.-19.P1	500 μl	55 μl	2,75
LI.20	Plasma	L.I.-20.P1	500 μl	55 μl	3,09
LI.21	Plasma	L.I.-21.P2	1,58ml	50 μl	0,531
	Suero	L.I.-21.S2	1,6ml	60 μl	4,64
	LCR	L.I.-21.LCR1	1ml	50 μl	17,1
	LCR	L.I.-21.LCR1	500 μl	30 μl	35,4
LI.22	Plasma	L.I.-22.P1	1,1ml	50 μl	0,57
	Suero	L.I.-22.S1	1,3ml	60 μl	22,8
	LCR	L.I.-22.LCR1	500 μl	30 μl	2,54

ID	DATOS MUESTRA			EXTRACCIÓN DNA CIRCULANTE	
	TIPO DE MUESTRA	MUESTRA	Vi	Vf	ng/μl
LI.23	Suero	L.I.-23.S1	500 μl	55 μl	7,8
	Plasma	L.I.-23.P1	500 μl	55 μl	3,49
LI.25	Suero	L.I.-25.S1	500 μl	55 μl	5,9
	Plasma	L.I.-25.P1	500 μl	55 μl	2,2
LI.26	LCR	L.I.-26.LCR1	1ml	50 μl	0,071
	Plasma	L.I.-26.P1	1,85ml	50 μl	0,393
	Suero	L.I.-26.S1	1,1ml	60 μl	1,58
LI.27	Suero	L.I.-27.S1	500 μl	55 μl	4,86
LI.28	Suero	L.I.-28.S1	500 μl	55 μl	7,2
	Plasma	L.I.-28.P1	500 μl	55 μl	2,29
LI.29	Suero	L.I.-29.S1	500 μl	55 μl	2,27
	Plasma	L.I.-29.P1	500 μl	55 μl	2,2
LI.30	LCR	L.I.-30.LCR1	3ml	<35 μl	1,68
	Plasma	L.I.-30.P1	2ml	<30 μl	0,84
	Suero	L.I.-30.S1	1,16ml	<25 μl	2,51
LI.31	Suero	L.I.-31.S1	500 μl	55 μl	1,93
	Plasma	L.I.-31.P1	500 μl	55 μl	1,97
LI.32	Plasma	L.I.-32.P1	500 μl	55 μl	2,38
LI.33	Suero	L.I.-33.S1	500 μl	55 μl	1,22
	Plasma	L.I.-33.P1	500 μl	55 μl	1,38
LI.34	Suero	L.I.-34.S1	500 μl	55 μl	3,7
	Plasma	L.I.-34.P1	500 μl	55 μl	2,49
LI.35	Suero	L.I.-35.S1	500 μl	55 μl	5,43
	Plasma	L.I.-35.P1	500 μl	55 μl	2,21
LI.36	Suero	L.I.-36.S1	500 μl	55 μl	2,64
	Plasma	L.I.-36.P1	500 μl	55 μl	2,09
LI.37	Suero	L.I.-37.S1	500 μl	55 μl	4,38
	Plasma	L.I.-37.P1	500 μl	55 μl	5,38
	LCR	L.I.-37.LCR1	550 μl	55 μl	2,54
LI.38	Suero	L.I.-38.S1	500 μl	55 μl	2,8
	Plasma	L.I.-38.P1	500 μl	55 μl	1,87
LI.39	Suero	L.I.-39.S1	500 μl	55 μl	2,74
	Plasma	L.I.-39.P1	500 μl	55 μl	1,97
LI.40	Suero	L.I.-40.S1	500 μl	55 μl	2,45
	Plasma	L.I.-40.P1	500 μl	55 μl	0,76
LI.41	Suero	L.I.-41.S1	500 μl	55 μl	0,42
	Plasma	L.I.-41.P1	500 μl	55 μl	0,225
LI.42	Suero	L.I.-42.S1	500 μl	55 μl	2,91
	Plasma	L.I.-42.P1	500 μl	55 μl	0,306
	LCR	L.I.-42.LCR1	900 μl	55 μl	0,178
LI.43	Suero	L.I.-43.S1	500 μl	55 μl	0,487
	Plasma	L.I.-43.P1	500 μl	55 μl	0,232
	LCR	L.I.-43.LCR1	750 μl	55 μl	0,122
LI.44	Suero	L.I.-44.S1	500 μl	55 μl	1,41
	Plasma	L.I.-44.P1	500 μl	55 μl	0,214
	LCR	L.I.-44.LCR1	1ml	55 μl	0,131

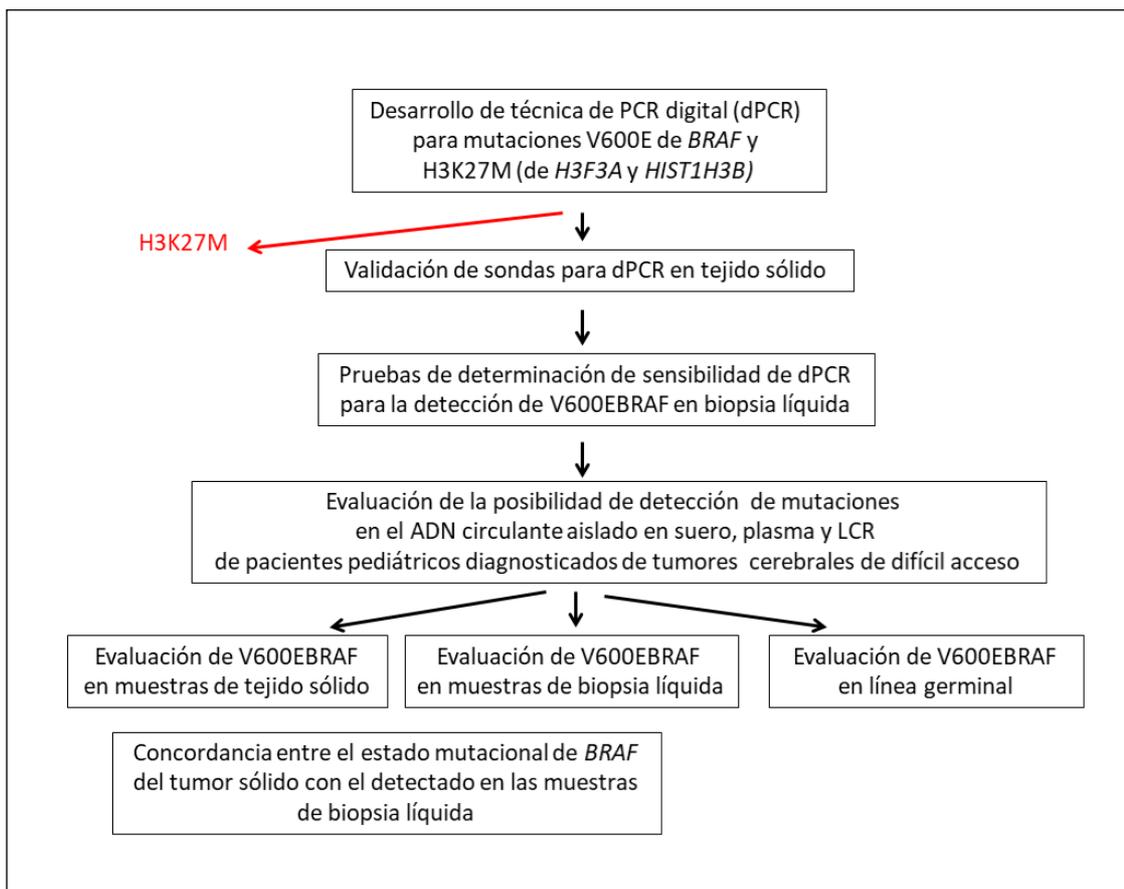
En amarillo se indican los pacientes y sus muestras correspondientes que se incluyeron en el estudio definitivo (N=29). ID: Identificación del paciente. Vi: volumen inicial. Vf: volumen final.

4. Desarrollo de técnicas de detección molecular

Paralelamente a la obtención de muestras, se llevaron a cabo múltiples ensayos y pruebas de validación de diferentes herramientas de detección de las **mutaciones puntuales BRAF V600E y H3K27M (K27M de H3F3 y K27M de HIST1H3B)** a partir del ADN purificado a partir de las muestras de suero, plasma y LCR.

Inicialmente se llevaron a cabo pruebas de **PCR convencional**, no resultando una técnica suficientemente sensible que aportase resultados satisfactorios en nuestro estudio, por lo que se centró el trabajo en la **dPCR (figura 24)**.

Figura 24. Flujo de trabajo realizado en el desarrollo de técnicas de detección molecular



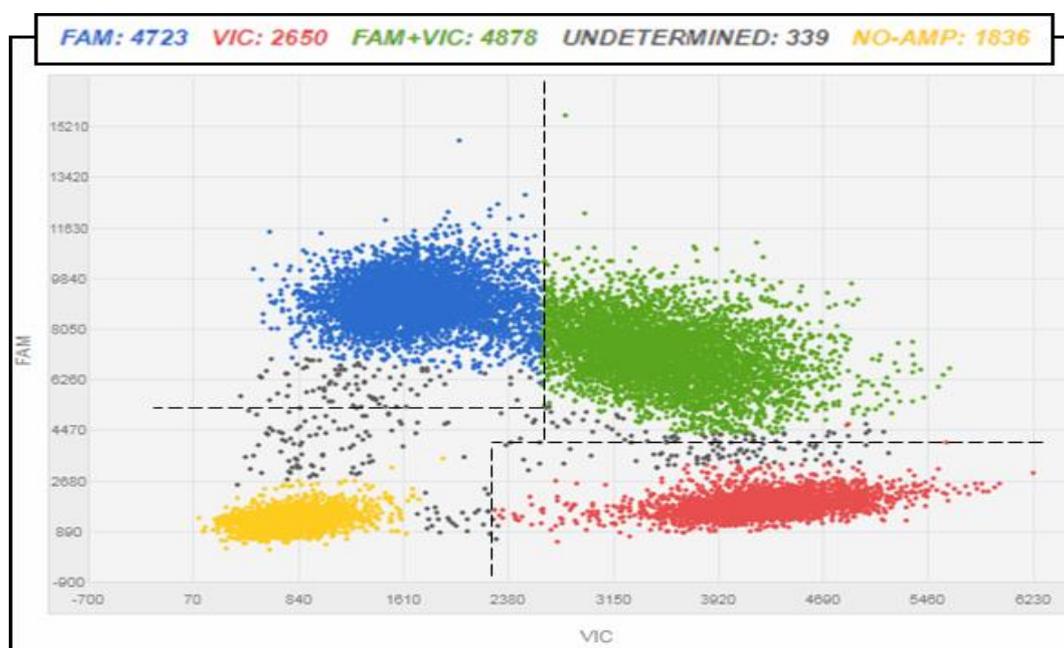
4.1. Pruebas de validación de sondas para BRAFV600E y H3K27M para dPCR en tejido sólido

Se procedió a realizar las pruebas de validación de las sondas para dPCR de las mutaciones V600E de *BRAF*, K27M de *H3F3* y K27M de *HIST1H3B* en ADN aislado de muestras de tejido sólido FPEE (tejido fijado con formalina e incluido en parafina).

En los casos de BRAFV600E y de K27M de *H3F3* se realizó la validación en ADN aislado de muestras de controles conocidos positivos para dichas mutaciones (TCGBM 18 y L.I.-1.b respectivamente).

En el caso de la sonda para la mutación V600E de *BRAF*, la dPCR en tejido detectó adecuadamente la existencia del alelo mutado en la muestra (figura 25).

Figura 25. Validación de la sonda para la mutación V600E de *BRAF* por dPCR en tejido sólido.



En azul aparecen las copias en las que se ha sido amplificado el alelo mutado. En rojo aparecen las copias en las que sólo ha sido amplificado el alelo no mutado. En verde aparecen las copias en las que se ha detectado tanto el alelo mutado como el no mutado. En amarillo aparecen las copias en las que no ha habido amplificación de ADN. En gris: indeterminado.

En el caso de la sonda para K27M de *H3F3*, esta dPCR de prueba se repitió dos veces (**figuras 26 y 27**) ya que los diferentes *clusters* o grupos obtenidos no resultaron tan evidentes como los obtenidos para la sonda de *BRAF*.

Figura 26. Validación de la sonda para la mutación K27M de *H3F3* por dPCR en tejido sólido. Réplica 1.

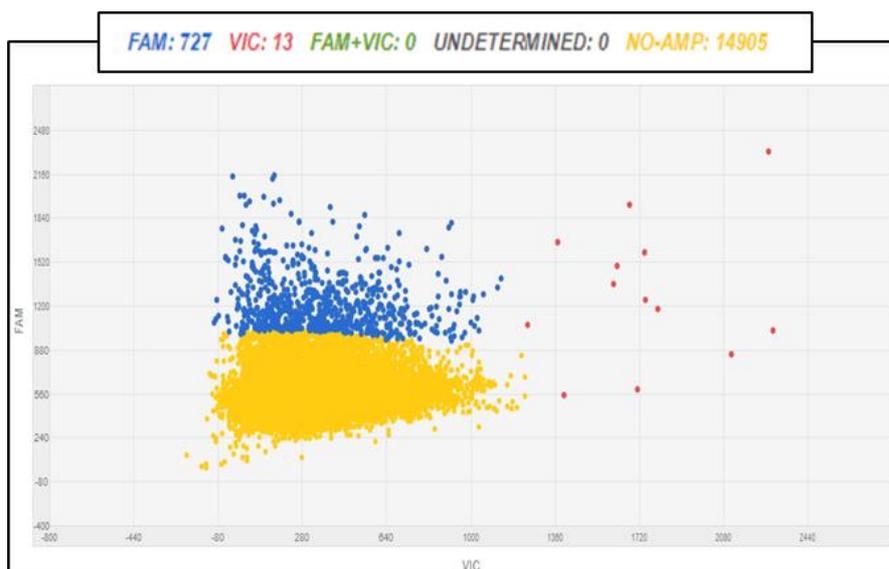
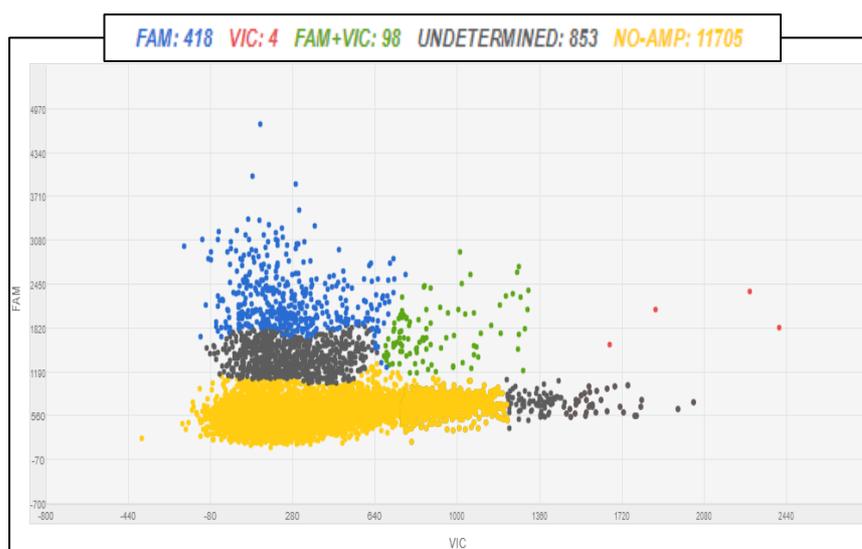
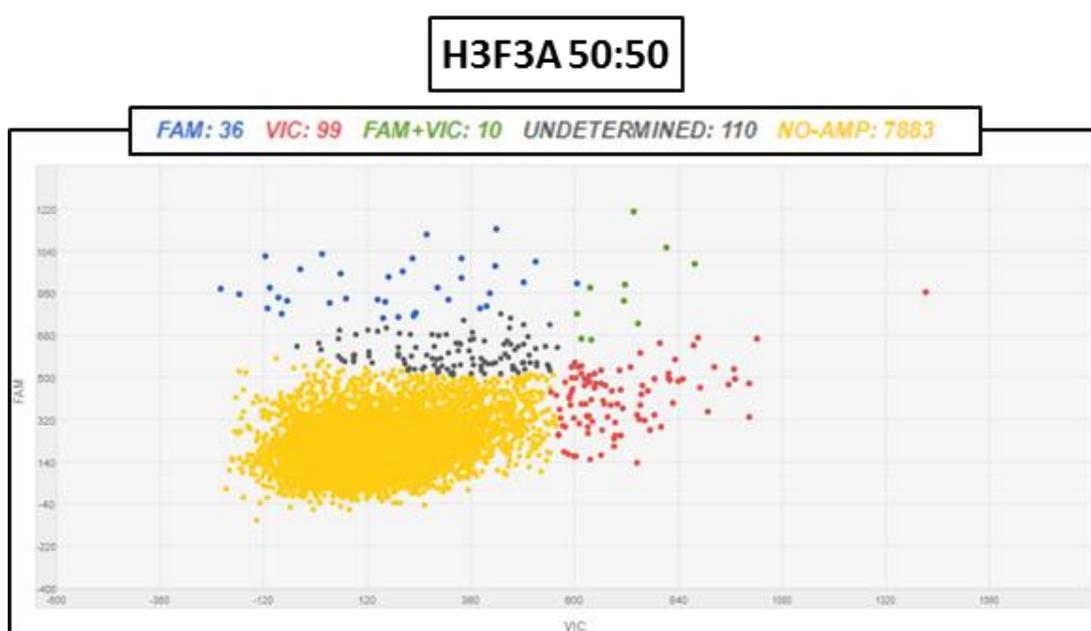


Figura 27. Validación de la sonda para la mutación K27M de *H3F3* por dPCR en tejido sólido. Réplica 2.



Posteriormente, para analizar la sensibilidad de la sonda diseñada para K27M de *H3F3*, se mezcló ADN de tejido sin la mutación con ADN del tejido con la mutación en 3 ratios diferentes: 50:50, 90:10 y 99:1 (WT:Mut.), con resultados no satisfactorios, ya que la señal de amplificación para el alelo mutado se fue perdiendo hasta no detectarse a partir del ratio 90:1 (**figuras 28-30**).

Figura 28. dPCR para la mutación K27M de *H3F3* en mezcla de tejidos con y sin mutación, con ratio WT:Mut 50:50.



En **azul**: copias en las que se ha sido amplificado el alelo mutado. En **rojo**: copias en las que sólo ha sido amplificado el alelo no mutado. En **verde**: copias en las que se ha detectado tanto el alelo mutado como el no mutado. En **amarillo**: copias en las que no ha habido amplificación de ADN. En **gris**: indeterminado.

Figura 29. dPCR para la mutación K27M de *H3F3* en mezclas de tejidos con y sin mutación, con ratio WT:Mut 90:10.

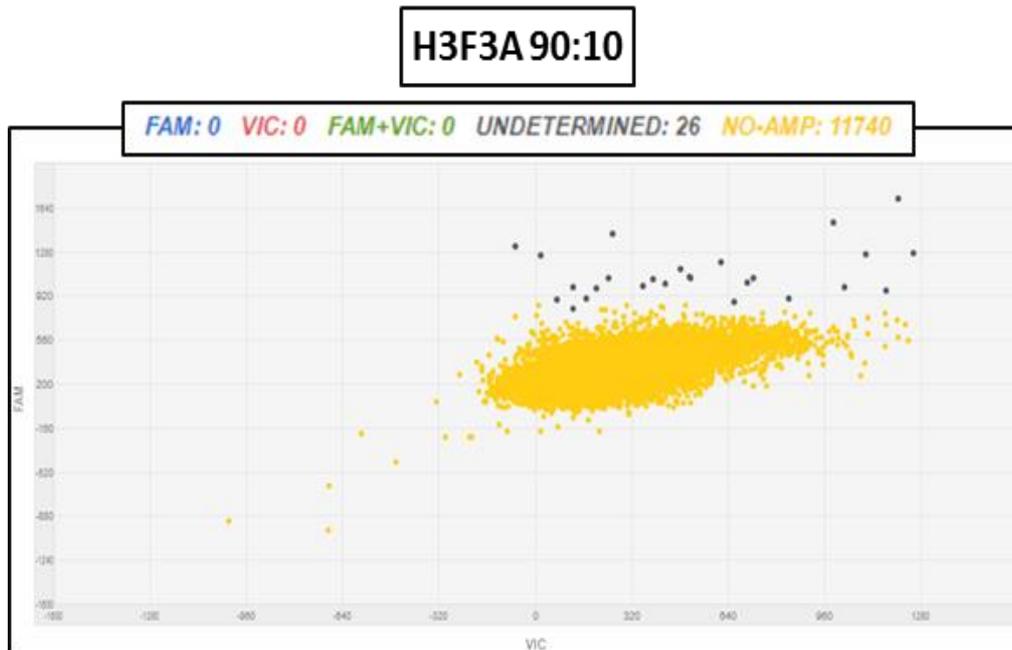
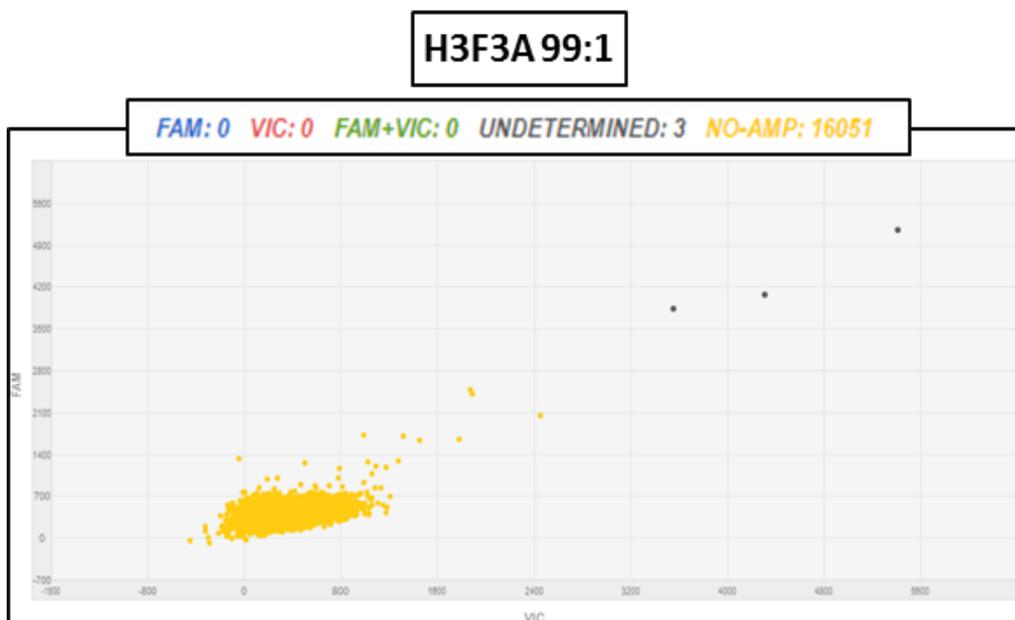


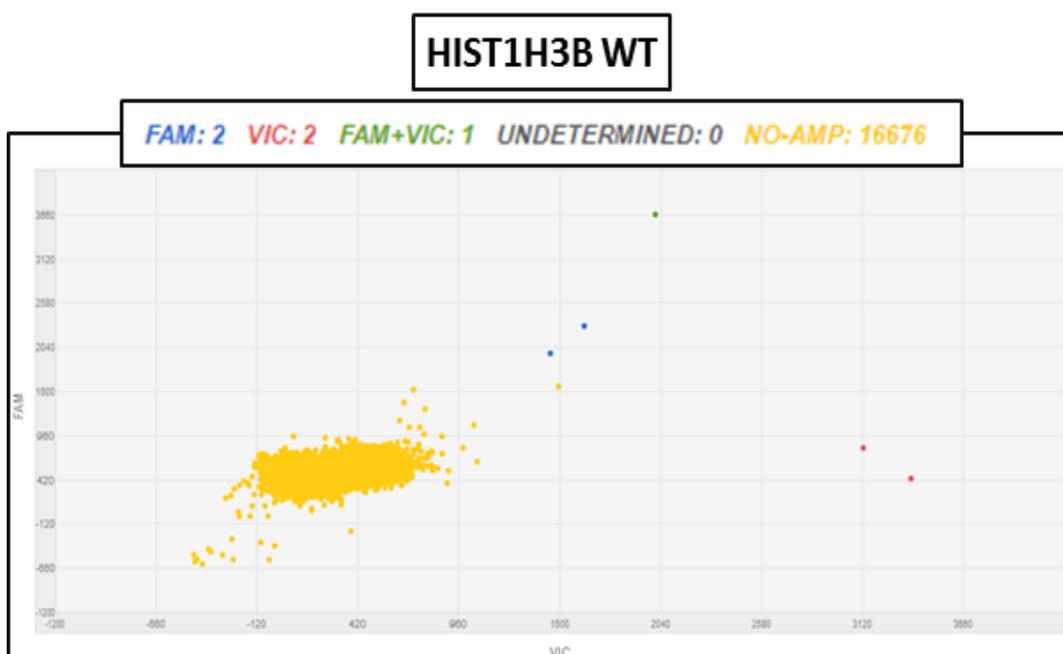
Figura 30. dPCR para la mutación K27M de *H3F3* en mezclas de tejidos con y sin mutación, con ratio WT:Mut 99:1.



La señal de amplificación para el alelo mutado (FAM) se fue perdiendo según se iba aumentando el porcentaje de cantidad de ADN de tejido no portador de la mutación, hasta no detectarse con ratio WT/mut de 90:10.

En el caso de K27M de *HIST1H3B*, al no disponer de muestras control que contuviesen la mutación, se llevó a cabo una dPCR de prueba con un tejido seleccionado al azar para comprobar que al menos detectase el alelo no mutado (**figura 31**). En este caso la dPCR no detectó prácticamente la existencia de alelo no mutado (VIC).

Figura 31. dPCR para la mutación K27M del gen *HIST1H3B* por dPCR.



Tras el análisis de estos ensayos para la validación de las sondas de dPCR en tejido sólido, **se optó por orientar el trabajo en la detección en biopsia líquida hacia el análisis de BRAFV600E**, ya que los resultados de las mutaciones H3K27M como se ha mostrado, no resultaron satisfactorias.

4.2. Pruebas de determinación de sensibilidad de la dPCR para la detección de la mutación V600E de BRAF en biopsia líquida

Posteriormente, se llevaron a cabo pruebas de puesta a punto de dPCR digital en muestras de biopsia líquida con la sonda para la mutación

BRAFV600E, con el objetivo de poder realizar posteriormente el análisis sistemático de las muestras de nuestra cohorte de pacientes definitiva. Para ello, se probó la capacidad de la técnica de dPCR de detectar el alelo mutado representado en una proporción cada vez menor en la muestra a estudio. Esto se llevó a cabo mediante diluciones progresivas de controles mutados con controles WT, llegando a detectar en proporción de 0,1% (figura 32).

Figura 32. Detección de la mutación V600E de *BRAF* mediante dPCR en diluciones progresivas de controles mutados.



Los porcentajes referidos en la parte superior representan la proporción de moléculas mutadas frente a las WT, por ejemplo, el porcentaje 1% significa que hay un 1% de moléculas de ADN mutadas frente 99% WT. En **azul** aparecen las copias en las que se ha sido amplificado el alelo mutado. En **rojo**: copias en las que sólo ha sido amplificado el alelo no mutado. En **verde**: copias en las que se ha detectado tanto el alelo mutado como el no mutado. En **amarillo** aparecen las copias en las que no ha habido amplificación de ADN. En **gris**: indeterminado.

Tras los ensayos referidos, se disponía de muestras simultáneas de suero, plasma y LCR en 29 de los 38 pacientes iniciales, **por lo que nuestra cohorte definitiva de pacientes para estudio de detección de mutación de BRAF, mediante dPCR, tenía una N total de 29.** Se aporta un resumen de las características y muestras disponibles de esta cohorte de pacientes en la **tabla 6.**

Tabla 6. Descripción de las características clínicas de los pacientes pediátricos a estudio con tumores del SNC y fuente de biopsia líquida obtenida en cada uno de ellos. Análisis de BRAF por PCR en línea germinal.

Paciente	Edad (años)	Diagnóstico	Biopsia líquida			Línea germinal
			Plasma	Suero	LCR	
LI.3	5	Meduloblastoma	+	+	+	SN
LI.4	7	Meduloblastoma	+	+	+	WT
LI.6	17	Glioma anaplástico	+	+	+	WT
LI.10	3	Glioma difuso	+	+	+	WT
LI.11	17	Astrocitoma pilocítico	+	+	+	WT
LI.15	7	DIPG	+	+		WT
LI.17	6	Ependinoma	+	+		WT
LI.18	15	DIPG		+	+	WT
LI.21	6	Glioma difuso	+	+	+	WT
LI.22	2	Astrocitoma pilomixóide	+	+	+	WT
LI.23	8	DIPG	+	+		WT
LI.25	8	Xantastrocitoma pleomórfico	+	+		WT
LI.26	15	Oligodendroglioma	+	+	+	WT
LI.28	7	DIPG	+	+		WT
LI.29	9	DIPG	+	+		WT
LI.30	12	Glioma difuso	+	+	+	WT
LI.31	2	Ganglioglioma	+	+		WT
LI.33	10	DIPG	+	+		WT
LI.34	4	DIPG	+	+		WT
LI.35	6	DIPG	+	+		WT
LI.36	6	Astrocitoma pilomixóide	+	+		WT
LI.37	18	Meduloblastoma	+	+	+	WT
LI.38	11	Astrocitoma pilocítico	+	+		WT
LI.39	3	PNET	+	+		WT
LI.40	15	Astrocitoma pilocítico	+	+		WT
LI.41	14	GBM	+	+		WT
LI.42	1	GBM	+	+	+	WT
LI.43	12	Glioma difuso	+	+	+	WT
LI.44	21	Astrocitoma pilocítico	+	+	+	WT

SN: muestra no disponible. WT: "Wild Type".

5. Evaluación de la posibilidad de detectar mutaciones en el ADN circulante aislado en suero, plasma y LCR de pacientes pediátricos y adolescentes diagnosticados de tumores cerebrales de difícil acceso

5.1. Estado mutacional del tumor en muestras sólidas

Como punto de partida, para disponer información adicional que contribuyese a poder determinar la capacidad de detección del estado mutacional de *BRAF* del tumor a partir del análisis de biopsia líquida, se evaluó el estado mutacional del tumor en las biopsias sólidas disponibles de los pacientes a estudio.

Se disponía de tejido tumoral al diagnóstico en 23 de los 29 pacientes de nuestra cohorte definitiva (79% de los pacientes).

Este tejido se obtuvo principalmente mediante resecciones del tumor en el 65% de los casos (15 de los pacientes). El resto de muestras se obtuvieron a partir de biopsias.

En los casos de resección quirúrgica, se realizaron resecciones subtotales (resección del 90-99% del volumen tumoral) en 6 de los pacientes, parciales (50-90% de resección tumoral) en 5 de los pacientes, siendo completa únicamente en el 26% de los pacientes (4 casos).

Se determinó el estado mutacional de *BRAF* en 13 de las 23 muestras tumorales, detectándose la mutación V600E en 4 de ellos (**tabla 7**).

Tabla 7. Descripción de disponibilidad de tejido tumoral y análisis de la mutación BRAF V600E en biopsia sólida en la cohorte de pacientes a estudio (N=29).

ID	DIAGNÓSTICO	LOCALIZACIÓN	OBTENCIÓN TEJIDO	DETECCIÓN DE BRAFV600E
LI.03	Meduloblastoma	Cerebelo	Resección subtotal	No realizado
LI.04	Meduloblastoma	Cerebelo	Resección completa	BRAFV600E-
LI.06	Glioma difuso línea media	Tálamo y mesencéfalo	Biopsia	BRAFV600E-
LI.10	Glioma difuso línea media	Tálamo	Biopsia	BRAFV600E-
LI.11	Astrocitoma pilocítico	Diencéfalo	Resección parcial	BRAFV600E-
LI.15	DIPG	Protuberancia	Biopsia	BRAFV600E-
LI.17	Ependimoma anaplásico	Fosa posterior	Resección completa	No realizado
LI.18	DIPG	Protuberancia	-	No biopsiado
LI.21	Glioma difuso de línea media	Tálamo y pedúnculo	Biopsia	No realizado
LI.22	Astrocitoma pilomixóide	Hemisferio y tálamo	Resección subtotal	BRAFV600E-
LI.23	DIPG	Protuberancia	-	No biopsiado
LI.25	Xantastrocitoma pleomórfico	Lóbulo temporal	Resección subtotal	BRAFV600E+
LI.26	Oligodendroglioma	Fosa posterior	Resección completa	No realizado
LI.28	DIPG	Protuberancia	-	No biopsiado
LI.29	DIPG	Protuberancia	-	No biopsiado
LI.30	Glioma difuso línea media	Tálamo	Biopsia	H3K27M+
LI.31	Ganglioglioma anaplásico	Cerebelo y tronco	Biopsia	BRAFV600E+
LI.33	DIPG	Protuberancia	-	No biopsiado
LI.34	DIPG	Protuberancia	Biopsia	H3K27M+
LI.35	DIPG	Protuberancia	Biopsia	H3K27M+
LI.36	Astrocitoma pilomixóide	Talámico izdo	Resección subtotal	BRAFV600E+
LI.37	Meduloblastoma	Fosa posterior	Resección subtotal	No realizado
LI.38	Astrocitoma pilocítico	Fosa posterior	Resección parcial	BRAFV600E+
LI.39	PNET	Hemisférico	Resección parcial	No realizado
LI.40	Astrocitoma pilocítico	Fosa posterior	Resección completa	Desconocido
LI.41	Glioblastoma	Fronto temporal	Resección parcial	BRAFV600E-
LI.42	Glioblastoma	Lóbulo frontal	Resección subtotal	BRAFV600E-
LI.43	Glioma difuso línea media	Cerebelo y pedúnculo cerebeloso	Resección parcial	BRAFV600E-
LI.44	Astrocitoma pilocítico	Fosa posterior	-	No disponible

5.2. Evaluación de la mutación BRAFV600E en línea germinal

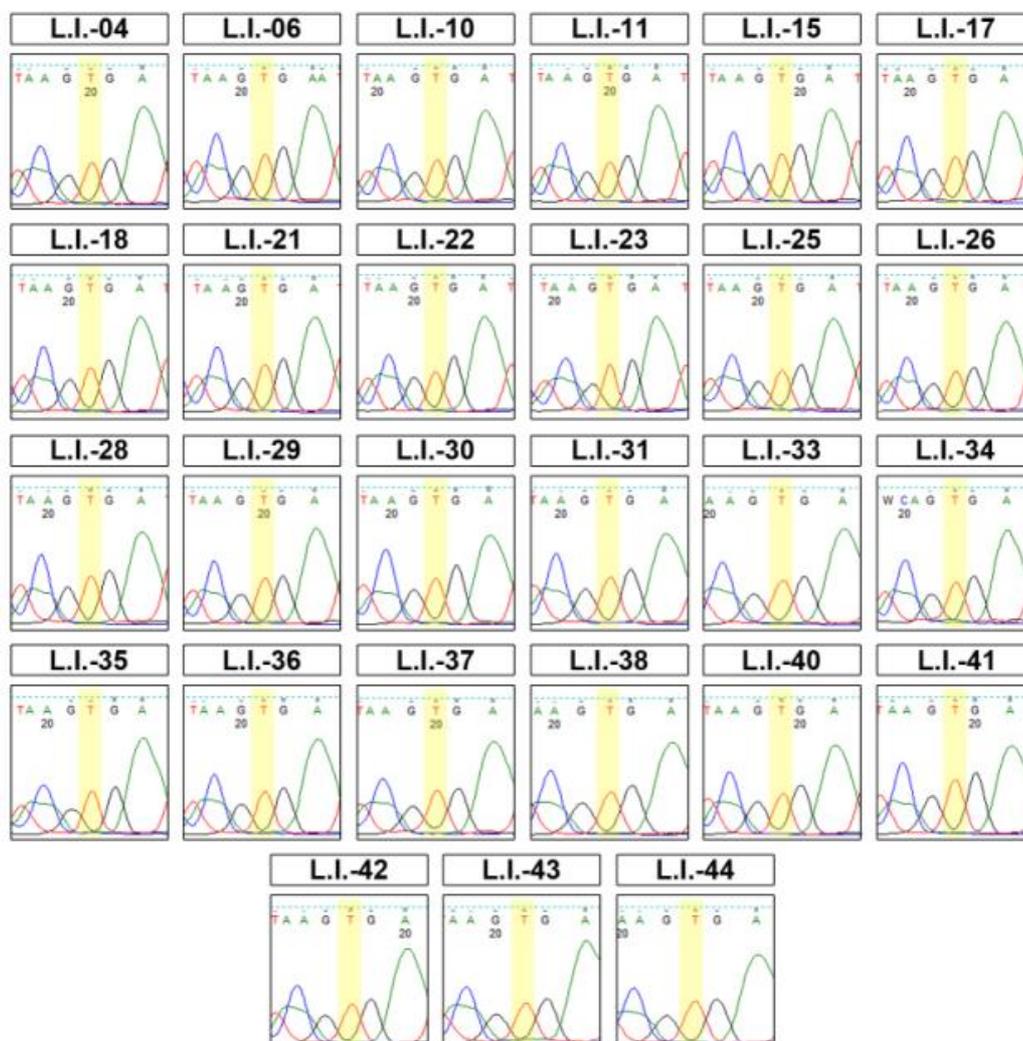
Con el objetivo de descartar mutaciones en línea germinal, se llevó a cabo la secuenciación del ADN obtenido de la suspensión leucocitaria (buffy coat), salvo para el paciente L.I 3, que no estaba disponible, no resultando ninguna de estas muestras portadora de la mutación BRAF V600E (**tabla 8 y figura 33**).

Tabla 8. Datos de la extracción de ADN a partir de las muestras de buffy coat.

BUFFY COAT. DATOS MUESTRA		EXTRACCION ADN	
MUESTRA	Vi	Vf	ng/ul
L.I.-04.BC1	1 alic.	100ul	27,2
L.I.-06.BC3	1 alic.	100ul	22,6
L.I.-10.BC2	1 alic.	100ul	46,2
L.I.-11.BC2	1 alic.	100ul	62,8
L.I.-15.BC3	1 alic.	100ul	23
L.I.-17.BC2	1 alic.	100ul	29,2
L.I.-18.BC1	1 alic.	200ul	17,6
L.I.-21.BC2	1 alic.	100ul	40
L.I.-22.BC1	1 alic.	100ul	300
L.I.-23.BC1	1 alic.	100ul	36
L.I.-25.BC1	1 alic.	100ul	24,2
L.I.-26.BC1	1 alic.	100ul	29,8
L.I.-28.BC1	1 alic.	100ul	25,4
L.I.-29.BC1	1 alic.	100ul	9,22
L.I.-30.BC1	1 alic.	100ul	18,8
L.I.-31.BC1	1 alic.	100ul	14,7
L.I.-33.BC1	1 alic.	100ul	13,8
L.I.-34.BC1	1 alic.	100ul	12,2
L.I.-35.BC1	1 alic.	100ul	10,4
L.I.-36.BC1	1 alic.	100ul	22,6
L.I.-37.BC1	1 alic.	100ul	15,6
L.I.-38.BC1	1 alic.	100ul	9,4
L.I.-40.BC1	1 alic.	100ul	13,5
L.I.-41.BC1	1 alic.	80ul	95,9
L.I.-42.BC1	1 alic.	80ul	60,3
L.I.-43.BC1	1 alic.	80ul	54,4
L.I.-44.BC1	1 alic.	80ul	64,8

Vi: volumen inicial. Vf: volumen final.

Figura 33. Comatogramas de secuencias de BRAF obtenidas de línea germinal.



En todos los pacientes se detectó el alelo salvaje (wild type) del gen de BRAF (Timina en lugar de la adenina en la forma mutada, codon 600 del exon 15) en línea germinal.

5.3. Evaluación de la mutación BRAFV600E en diferentes fuentes de biopsia líquida

En este punto, se evaluó la capacidad de detectar la mutación BRAF en el ADN libre circulante aislado de las muestras de suero, plasma y LCR de los pacientes de nuestra cohorte (**tabla 9**).

En cuanto a la muestras de **suero**, se llevó a cabo esta evaluación en todos los pacientes del estudio, excepto para LI.18, paciente del cual esta muestra no estaba disponible, siendo por tanto la N de 28. **Se detectó la mutación V600E de BRAF en 3 de los pacientes** (LI.31, LI.33 y LI.38).

Asimismo, se estudiaron las muestras de **plasma** en la totalidad de los pacientes de nuestra cohorte (N=29) y **se identificó la mutación en 3 pacientes** (LI.10, LI.11 and LI.36).

En cuanto al estudio mutacional del **LCR**, desafortunadamente, no se detectó amplificación en un 35,7% del ADN aislado a partir de las muestras de LCR, y sólo dos muestras (L.I.4 y L.I.37) mostraron la presencia de la mutación puntual de BRAF.

De forma sorprendente e inesperada, en todos aquellos pacientes en los que se obtuvo un resultado positivo en la detección de la mutación, éste sólo se determinó en una de las fuentes de biopsia líquida, no detectándose en el resto de muestras disponibles de ese paciente en concreto.

Con los resultados obtenidos, se procedió a analizar la concordancia entre el estado de la mutación BRAF en el tumor original y en la biopsia líquida.

Tabla 9. Analisis de BRAF V600E en ctADN aislado en suero, plasma, LCR por dPCR y en tumor original por PCR convencional.

Paciente	BRAF V600E				p-valor		
	ctDNA suero	ctDNA plasma	ctDNA LCR	Biopsia sólida	ctDNA suero	ctDNA plasma	ctDNA LCR
LI.3	WT	WT	WT	SN	5.75 x10 ⁻¹	3.89 x10 ⁻¹	5.08 x10 ⁻¹
LI.4	NA	WT	MUT	WT	NA	4.71 x10 ⁻¹	9.13 x10 ⁻³
LI.6	WT	WT	NA	WT	1	9.50 x10 ⁻¹	NA
LI.10	WT	MUT	NA	WT	4.94 x 10 ⁻¹	2.10 x10 ⁻⁴	NA
LI.11	WT	MUT	WT	WT	7.69 x 10 ⁻¹	2.56 x10 ⁻⁶	6.66 x10 ⁻¹
LI.15	WT	WT	SN	WT	2.64 x 10 ⁻¹	3.15 x10 ⁻¹	-
LI.17	WT	WT	SN	SN	5.91 x10 ⁻¹	1	-
LI.18	SN	WT	NA	SN	-	2.30 x10 ⁻¹	NA
LI.21	WT	WT	WT	SN	5.96 x10 ⁻¹	6.17 x10 ⁻¹	8.87 x10 ⁻¹
LI.22	WT	WT	WT	WT	7.58 x10 ⁻¹	9.34 x10 ⁻¹	9.46 x10 ⁻¹
LI.23	WT	WT	SN	SN	3.09 x10 ⁻¹	5.40 x10 ⁻¹	-
LI.25	WT	WT	SN	MUT	8.27 x10 ⁻¹	9.54 x10 ⁻¹	-
LI.26	WT	WT	NA	SN	6.20 x10 ⁻¹	7.23 x10 ⁻¹	NA
LI.28	WT	WT	SN	SN	5.78x10 ⁻¹	9.51 x10 ⁻¹	-
LI.29	WT	WT	SN	SN	7.74 x10 ⁻¹	5.98 x10 ⁻¹	-
LI.30	WT	WT	WT	SN	8.74 x10 ⁻¹	8.00 x10 ⁻¹	9.48 x10 ⁻¹
LI.31	MUT	WT	SN	MUT	1.74 x10 ⁻²	4.50 x10 ⁻¹	-
LI.33	MUT	WT	SN	SN	4.64 x10 ⁻³	2.88 x10 ⁻¹	-
LI.34	WT	WT	SN	SN	8.47x 10 ⁻¹	2.93 x10 ⁻¹	-
LI.35	WT	WT	SN	SN	3.60 x10 ⁻¹	1.17 x10 ⁻¹	-
LI.36	WT	MUT	SN	MUT	3.64 x10 ⁻¹	6.72 x10 ⁻⁴	-
LI.37	WT	WT	MUT	SN	3.85 x10 ⁻¹	5.93 x10 ⁻¹	2.17 x10 ⁻⁸
LI.38	MUT	WT	SN	MUT	2.33 x10 ⁻⁴	5.02 x10 ⁻¹	-
LI.39	WT	WT	SN	SN	4.61 x10 ⁻¹	5.13 x10 ⁻¹	-
LI.40	WT	WT	SN	SN	8.76 x10 ⁻²	4.92 x10 ⁻¹	-
LI.41	WT	WT	SN	WT	4.91 x10 ⁻¹	9.56 x10 ⁻¹	-
LI.42	WT	WT	WT	WT	6.38 x10 ⁻¹	5.24 x10 ⁻¹	6.85 x10 ⁻¹
LI.43	WT	WT	WT	WT	2.73 x10 ⁻¹	2.96 x10 ⁻¹	4.03 x10 ⁻¹
LI.44	WT	WT	NA	SN	8.81 x10 ⁻¹	7.23 x10 ⁻²	NA

WT: *Wild type*. NA: No amplificado. SN: Muestra no disponible.

En las columnas del apartado de la izquierda, se muestran los resultados de las dPCR para la detección de BRAFV600E en las diferentes fuentes de biopsia líquida de los pacientes de nuestra cohorte y se compara con los resultados de la detección de la mutación en tejido sólido (por PCR convencional). En las columnas del apartado de la derecha, se muestran los valores obtenidos de p mediante el análisis estadístico basado en la distribución de probabilidad de *Poisson* para determinar los resultados de la técnica de dPC en biopsia líquida, bien como mutado o bien como *wildtype*, tal y como se indica en el apartado de material y métodos.

5.4. Concordancia del estado mutacional de BRAF en tumor sólido y en biopsia líquida

Para afianzar la utilidad de las biopsias líquidas para la detección de biomarcadores, se analizó la **concordancia entre el estado de la mutación BRAF en el tumor original y en la biopsia líquida** para así definir los **parámetros de exactitud diagnóstica de la técnica (tabla 10)**.

Al disponer únicamente de cinco muestras pareadas entre LCR y tejido, el estudio se realizó en ctDNA aislado de suero y plasma.

Según los resultados de dPCR, **el ctDNA del suero representa mejor el estado de la mutación BRAF en tumores sólidos emparejados que en plasma.**

La información genética encontrada en el plasma mostró una sensibilidad del 25% y una especificidad del 77,8%, mientras que el ctADN del suero tuvo una sensibilidad del 50% y una especificidad del 100% para la detección de la mutación BRAF V600E.

Por lo tanto, se encontró que el suero era más representativo del tumor original.

Sin embargo, los hallazgos de nuestro estudio deben interpretarse con cautela ya que el análisis corresponde a una pequeña cohorte.

En particular, hubo discrepancias en las muestras del paciente LI.25, en cuya biopsia sólida se detectó previamente la mutación, mientras que los resultados de dPCR ofrecieron fenotipo WT en muestras de suero y plasma.

Tabla 10. Concordancia entre biopsia sólida y biopsia líquida (N=13).

			BIOPSIA SÓLIDA		<i>SENSIBILIDAD</i>	<i>ESPECIFICIDAD</i>	<i>VPP</i>	<i>VPN</i>	<i>EXACT</i>
			MUT	WT					
BIOPSIA LIQUIDA	Plasma	MUT	1	2	25%	77,8%	33,3%	70%	61,5%
		WT	3	7					
		Total	4	9					
	Suero	MUT	2	0	50%	100%	100%	80%	83,3%
		WT	2	8					
		Total	4	8					

MUT: Mutado. WT: *Wild Type*. VPP: Valor predictivo positivo. VPN: Valor predictivo negativo. EXACT: Exactitud.

5.5. Respuesta al tratamiento dirigido de un paciente diagnosticado de ganglioglioma con mutación V600E de BRAF

Con el objetivo de **expresar la relevancia del valor clínico** que conllevaría el poder detectar las alteraciones moleculares a partir de una muestra de biopsia líquida, se presenta el caso clínico del paciente LI.31.

Este paciente fue diagnosticado de, ganglioglioma cerebeloso irresecable a los 2 años de edad, en el año 2012 y se objetivó la progresión lenta de su enfermedad con marcadas secuelas neurológicas, a pesar del tratamiento con quimioterapia y radioterapia.

A los dos años de evolución, se procedió a realizar estudio mutacional de *BRAF* en la biopsia sólida extraída al diagnóstico, detectándose la mutación BRAFV600E por PCR convencional.

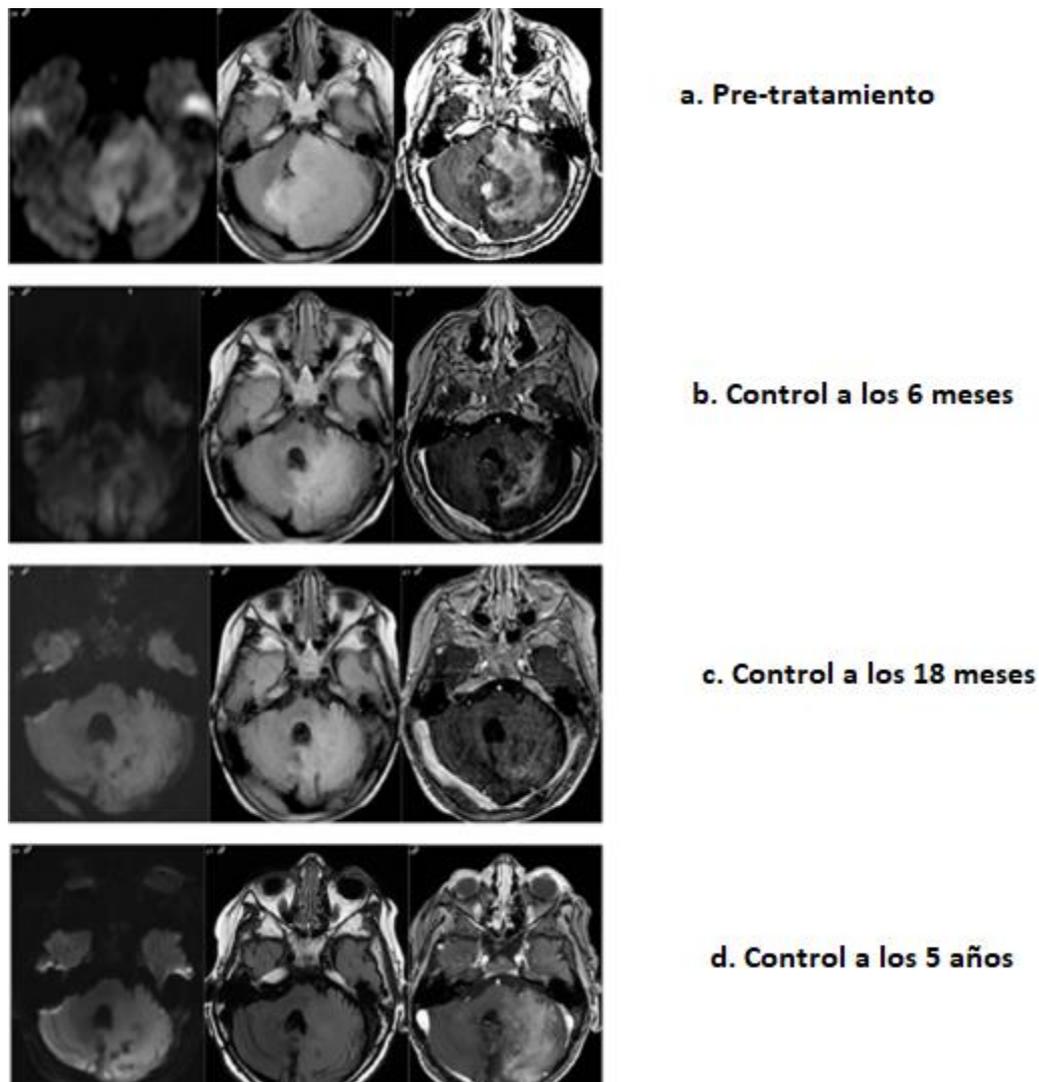
En ese momento, la RM evidenciaba un gran tumor cerebeloso que se extendía hacia el tronco encefálico, cruzando la línea media, con gran efecto masa que originaba obliteración del cuarto ventrículo.

El paciente inició el tratamiento dirigido a la alteración molecular detectada con un inhibidor de BRAF, dabrafenib, a dosis de 2 mg / kg, dos veces al día, por vía oral.

El paciente mejoró clínicamente de forma significativa, pudiendo llevar a cabo las actividades habituales para su edad. El control de imagen con RM a los 6 meses confirmó una reducción significativa del volumen y realce tumoral, del efecto masa, consistente con una respuesta parcial basada en los criterios de RANO (*Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group*).

Actualmente, el paciente se mantiene en una situación clínica y radiológica estable con terapia de mantenimiento (**figura 34**). Cuando se analizaron las biopsias líquidas de este paciente (tabla 9), solo la muestra de suero demostró concordancia con los resultados obtenidos en la biopsia sólida anterior, positivo para mutación BRAFV600E, mientras que el análisis de plasma reveló un estado mutacional WT.

Figura 34. Imágenes de RM del paciente LI.31 antes y durante el tratamiento con dabrafenib.



(a) Imágenes previas al tratamiento. La imagen FLAIR axial muestra una gran masa que afecta el hemisferio cerebeloso izquierdo y la protuberancia con un marcado efecto masa en el cuarto ventrículo. La imagen de difusión axial (DWI) revela una difusión restringida intratumoral. La imagen axial T1 poscontraste muestra un intenso realce. (b, c) Seguimiento a los 6 y 18 meses. FLAIR axial, DWI y poscontraste demuestran una disminución en la extensión de la masa y en la masa efecto con una contracción en progresiva mejoría. (d) Seguimiento a los 5 años. No se aprecia progresión en FLAIR axial, e incluso, si reaparece el realce, la restricción de la difusión permanece ausente.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se ha diseñado y validado una técnica para la identificación de la mutación V600E en el gen *BRAF* a partir de ADN circulante en muestras de biopsias líquidas de pacientes pediátricos y adolescentes con diagnóstico de tumores cerebrales de difícil acceso y/o inoperables. Dado que la mutación en el gen *BRAF* es un biomarcador de sensibilidad a terapias dirigidas como los inhibidores de MEK y de BRAF, la aplicación de esta técnica ofrecería una herramienta de gran utilidad en el manejo clínico en estos pacientes.

1. Disponibilidad de muestras para la validación.

Se realizó un diseño de estudio con el objetivo de reclutar de forma prospectiva, en un periodo de 3 años, 30 pacientes pediátricos y adolescentes diagnosticados de tumores cerebrales de difícil acceso y/o inoperables. Dada la dificultad tanto de reclutar pacientes debido a la baja incidencia de la patología, como de la obtención de las muestras^{28,29}, se procedió a dar difusión al proyecto de investigación a través de la SEHOP, con el objetivo de aumentar así el número de pacientes.

2. Características de la cohorte a estudio.

En cuanto a la **distribución por sexo**, existe un claro predominio de varones, y esto concuerda con los datos existentes de mayor prevalencia en el sexo masculino, tanto del cáncer infantil de forma global, como del subgrupo de tumores cerebrales descrita en la población general, aunque el ratio hombre/mujer es más alto en nuestra serie (1,9 vs 1,2)²⁹.

La **edad** de incidencia de los tumores cerebrales varía con el subtipo histológico. En la cohorte definitiva a estudio, el tumor predominante fue el glioma difuso, representando un 41% de los casos. Aunque este subtipo se describe en cualquier edad pediátrica, la edad media de aparición se describe en torno a los 7 años, lo que se aproxima a la edad media de nuestra cohorte (9 años) ¹⁴⁰.

En cuanto a los **tumores** a estudio, todos ellos fueron catalogados de difícil acceso quirúrgico y/o inoperables. Estos criterios se definieron en base a criterios anatómicos definidos por RM, valorados por especialistas en neurocirugía, neurorradiología y oncología pediátrica de sus hospitales de origen, siendo unidades de referencia en el manejo de estas patologías.

La **localización** en línea media fue el criterio más predominante para considerar el difícil el acceso quirúrgico (62%). Este hecho explica la alta prevalencia de gliomas de alto grado de nuestra cohorte (48%), ya que es una localización predilecta por este tipo de tumores en la edad infantil^{38,39}.

3. Procedimientos preanalíticos.

Para lograr un uso clínico eficiente de esta técnica, los expertos coinciden en que resulta fundamental la **estandarización de los procedimientos preanalíticos y analíticos** para cada componente de las biopsias líquidas.

Ya se han llevado a cabo diversos trabajos dirigidos en este camino, y hay que mencionar las redes pertinentes como es el caso del *Cancer-ID* en Europa (<https://www.cancer-id.eu/the-project/overview/>).

Cancer-ID es un consorcio europeo recién creado por la Iniciativa de Medicamentos Innovadores (IMI) en el año 2015, que cuenta actualmente con 36 socios de 13 países, cuyo objetivo es el establecimiento de protocolos estándar y la validación clínica de biomarcadores circulantes en sangre¹⁴¹.

En el presente estudio, se ha seguido de **manera escrupulosa los protocolos de laboratorio** establecidos de acuerdo a las recomendaciones vigentes en cuanto a procedimientos de recolección, manipulación y almacenamiento de las muestras para evitar la degradación del ADN¹⁴².

En referencia al trabajo preanalítico, se utilizaron los tubos de extracción de sangre tipo EDTA (anticoagulante) para el posterior aislamiento del plasma, y tubos con gel separador para el posterior aislamiento del suero, respetando el tiempo recomendado entre la extracción y el procesamiento de entre 2 y 6 horas con el uso de estos tubos, para evitar la lisis leucocitaria y el consiguiente aumento de ADN circulante no tumoral, así como la técnicas de doble centrifugación para la correcta separación de los componentes celulares y líquidos de las muestras.

Así mismo, se respetaron las condiciones de almacenamiento para obtener la mejor conservación posible del ADN circulante¹⁴³.

Se llevó a cabo la congelación de las muestras de plasma y suero en alícuotas de un solo uso, ya que se ha comprobado que la exposición a un solo ciclo de congelación-descongelación no afecta posteriormente al análisis de ADN circulante, pero múltiples ciclos de congelación-descongelación sí pueden ocasionar degradación de los ácidos nucleicos, y por tanto disminuir la capacidad de detección de las mutaciones a estudio¹¹².

No obstante, hay que indicar que la mayor experiencia obtenida por estos grupos de expertos hasta el momento, proviene de tumores sólidos del adulto, principalmente de pulmón y mama, y que en el caso de otros tipos tumorales, como son los cerebrales, no existen protocolos estandarizados para toda la comunidad investigadora, existiendo, por tanto, mucho trabajo por desarrollar al respecto.

4. Diseño de herramientas para la detección de marcadores moleculares.

4.1. Aislamiento y cuantificación de ADN circulante.

Para la detección de mutaciones puntuales como es el caso de la V660E de *BRAF*, se optó por el análisis de ADN libre circulante.

En cuanto a no haber optado por el estudio de las células tumorales circulantes (CTCs) en el presente estudio, con mayor estabilidad y vida media en comparación al ADN circulante, hay que señalar que su aislamiento representa un enorme desafío tecnológico.

En el caso de tumores de tipo epitelial, el estudio de las CTCs resulta algo menos complejo, dado que se pueden identificar proteínas de membrana a las cuales dirigir anticuerpos para su “captura”, como la EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales)^{144,145}. Pero en el caso de tumores primarios del SNC, estos marcadores no son sencillos de identificar, y además, se precisa de una mayor cantidad de biofluido a estudio para poder detectarlas, requerimiento que es complicado de aplicar en la población pediátrica⁹⁴.

Se han reportado detecciones de CTCs en glioblastomas del adulto, pero indudablemente no es la técnica más óptima para el estudio de biomarcadores mediante biopsia líquida en el caso de tumores del SNC. Además, hay que referir que las células liberadas probablemente tampoco sean representativas de todo el tumor en su conjunto, tal y como ocurre con las biopsias sólidas^{127,143,146}.

Otra alternativa, u opción a considerar, para intentar aumentar la sensibilidad en la identificación de biomarcadores en biopsia líquida en aquellos casos con una baja frecuencia de alelo mutado, como es el caso de los tumores cerebrales infantiles, sería completar el análisis con el **aislamiento del ADN contenido específicamente en el**

interior de vesículas extracelulares (EVs), habiéndose comprobado que estos elementos tienen la capacidad de atravesar la BHE y detectarse en sangre periférica^{100,132}.

En relación a la cantidad de ADN circulante de nuestra cohorte definitiva a estudio, se obtuvieron menores concentraciones en sangre a las descritas en otros estudios de biopsia líquida en tumores extracraneales, como hígado, colon o mama, debido al conocido efecto aislante de la BHE¹⁴⁷. En los pacientes con estos tumores, existe relación entre la cantidad de ctADN aislado en plasma con el pronóstico clínico, observándose una menor supervivencia en aquellos con mayor concentración¹⁴⁸. Dicha observación puede ser objeto de estudio en próximos proyectos en tumores cerebrales.

4.2. Elección de dPCR en comparación a otras técnicas como herramienta de detección molecular.

Para que los biomarcadores circulantes sean clínicamente útiles, deben ser altamente específicos del tumor y además deben estar presentes en concentraciones que puedan ser detectables con las herramientas disponibles¹⁴⁹.

En el presente estudio, la mutación V600E de *BRAF* cumple con el requisito de alta especificidad para el tumor a estudio, y en cuanto a la sensibilidad para poder detectar la mutación, nos enfrentamos a una de las principales limitaciones en los intentos de detección de aberraciones genéticas a partir de muestras de biopsia líquida⁹⁰.

Para intentar solventar este problema, se ha optado por la **dPCR**, ya que ha demostrado ser más eficiente en la detección de alelos de baja frecuencia, en comparación con los métodos tradicionales¹⁵⁰.

La **qPCR** (PCR en tiempo real) tradicional, amplifica todas las moléculas diana presentes en la muestra, y ofrece una señal promedio, en la cual, una secuencia infrarrepresentada, como son las secuencias

mutadas de origen tumoral presentes en una fuente de biopsia líquida, puede ocultarse por las secuencias WT, altamente representadas¹⁴⁷.

En contraste, en la **dPCR**, la muestra de DNA aislado se divide de tal manera que, cada compartimento contiene una única secuencia diana, que se amplifica ofreciendo señales individuales que son detectadas y cuantificadas mediante el análisis de fluorescencia¹⁵¹, aumentándose por lo tanto de forma muy significativa la sensibilidad de la prueba respecto a los métodos convencionales. La sensibilidad en esta técnica depende, por tanto, del número de compartimentos que se es capaz crear y analizar, así como del ratio de FP de cada ensayo.

Además, partiendo de la base de la dPCR, se ha trabajado con el sistema **Quantstudio**, que disminuye los volúmenes de reacción, utilizando **microcámaras**, pudiendo aumentar de esta forma el número de compartimentos analizados, incrementando, por tanto, la sensibilidad de detección.

A pesar de la aplicación de esta herramienta, para alcanzar nuestro objetivo de conseguir un biomarcador óptimo, sería deseable obtener aún más sensibilidad de detección.

Técnicamente se podría conseguir añadiendo **sistemas de PCR en emulsión** (ePCR o ddPCR) al uso de microcámaras utilizadas en nuestro estudio. Estos sistemas ya están comercializados, y se basan en la compartimentación mediante gotitas acuosas dispersas en aceite, que varían desde pocos femtolitros a nanolitros, abriendo la posibilidad de disponer de un número teóricamente ilimitado de compartimentos¹⁵². No obstante, se debe tener en cuenta que esta técnica es altamente compleja para un futuro uso clínico de rutina.

Otra opción que se podría considerar para la detección de mutaciones en biopsia líquida en nuestra cohorte, sería una **técnica de NGS** en lugar de dPCR.

La ventaja que ofrece la NGS es la posibilidad de aumentar el número de mutaciones detectadas. Esta técnica ya se ha utilizado en biopsia líquida en adultos (incluyendo casos de glioblastoma)¹⁵³ y en niños, en el caso del neuroblastoma¹⁵⁴.

Los métodos basados en dPCR están limitados por el número de mutaciones que pueden detectarse y son más eficaces cuando se utilizan dirigiéndose a una única mutación³⁸.

Como hemos desarrollado previamente, los tumores cerebrales pediátricos pueden ser portadores de varias mutaciones, tanto en un mismo gen, diferenciados por un cambio de un nucleótido único, como en varios genes^{61,75,78}. Este hecho justifica el planteamiento de utilizar la NGS en biopsia líquida para el estudio de las aberraciones genéticas en estos pacientes, no sólo en el diagnóstico, sino en el análisis posterior de posibles mutaciones adquiridas durante su evolución, o incluso en el caso de desconocer el perfil molecular.

No obstante, es importante señalar que la NGS, en comparación con la dPCR, es menos sensible, más cara y requiere más tiempo en su realización¹⁵⁵.

5. Validación de dPCR para la determinación de la mutación BRAFV600E en biopsia líquida.

En cuanto a las limitaciones que encontramos en nuestro estudio, la principal es es la **probabilidad de encontrar falsos negativos** en el análisis de las muestras líquidas, aunque como hemos referido, también se pueden encontrar en el análisis estándar de oro, ya que las biopsias sólidas no reflejan necesariamente toda la variabilidad clonal del tumor¹⁰⁹.

Además, estos resultados constituyen de momento una prueba de concepto para el uso de suero y plasma como fuentes de biomarcadores en pacientes pediátricos, precisándose cohortes de mayor tamaño para poder consolidar dicha herramienta.

Con objeto de afianzar la utilidad de las biopsias líquidas para la detección de biomarcadores, **se analizó la concordancia entre el estado de la mutación BRAFV600E en el tumor original y en la biopsia líquida, para así definir los parámetros de exactitud diagnóstica de la técnica.**

La PCR convencional y la secuenciación posterior, revelaron la presencia de la mutación BRAFV600E en las biopsias sólidas de cuatro gliomas de bajo grado.

Estos resultados corroboran estudios previos, mostrando que, esta mutación, aparece en más de la mitad de los casos de xantastrocitomas pleomórficos⁵⁹ (como el paciente LI.25), en el 20% de los gangliogliomas, y hasta en el 10% de los astrocitomas pilocíticos¹⁵⁶ (que corresponden con los pacientes LI.31 y LI.38, respectivamente). La otra muestra mutada en nuestra cohorte corresponde a un astrocitoma pilomixoide (LI.36), entidad considerada actualmente variante del astrocitoma pilocítico, pero de curso generalmente menos indolente. Tanto los astrocitomas pilocíticos como los pilomixoides presentan activación de la vía Ras/ERK de forma predominante a través de la fusión KIAA1549-BRAF, no analizada en nuestro estudio, pero se describe también la existencia en algunos casos de la mutación puntual V600E¹⁵⁷, como se refleja en los casos de estos dos pacientes.

En todos los casos, excepto para LI.25, BRAFV600E fue confirmado en nuestro estudio por dPCR en suero o plasma.

Aunque estudios recientes muestran que el LCR es una fuente óptima para la caracterización molecular de los tumores cerebrales, y más representativa del tumor original que el plasma, debido a que se encuentra en íntimo contacto con el tumor y elude la BHE^{91,158,159}, la capacidad de detección mutacional de la técnica en LCR no se ha

podido evaluar en el presente estudio, ya que solo se disponía de cinco muestras pareadas cuyas biopsias sólidas hubieran sido analizadas para la mutación de *BRAF*.

No obstante, destaca que el análisis de los resultados obtenidos en LCR, previos al análisis estadístico para definir con fiabilidad el estado mutacional de *BRAF* (que como referimos, no se pudo llevar a cabo en este biofluido), no detectó amplificación en un 35,7% de las muestras. Estos datos son similares a limitaciones reportadas por otros grupos, con problemas en la amplificación del ctDNA en el 33% de las muestras de LCR, dependiendo del procedimiento de obtención de éste¹⁶⁰.

La escasez de muestras pareadas para estudio de *BRAF* en LCR y en tejido sólido, se debe, por una parte, a la dificultad de obtención de LCR en comparación a las muestras de sangre, motivo por el cual no se sometió al participante a este procedimiento con el único objetivo de obtener muestra para el estudio, sino que se obtuvieron las muestras en el mismo acto indicado por su médico responsable como parte del manejo clínico habitual. Y por otra parte, sólo disponíamos de información sobre el estado mutacional de *BRAF* en tejido sólido en 13 de los 29 pacientes, ya que la indicación de realizar este análisis se llevó a cabo bajo el criterio de un patólogo ajeno a nuestro proyecto de investigación, guiado por la prevalencia de esta mutación en el tumor concreto a estudio.

De forma inesperada, las dos únicas muestras de LCR en las cuales se detectó la mutación de *BRAF* corresponden a casos de meduloblastomas, tumores en los cuales no está descrita esta mutación. Ello nos conduce a pensar en tres posibilidades.

En primer lugar, un error en el procesamiento de las muestras que haya originado una contaminación.

Otra posibilidad, sería la existencia de un falso positivo debido a falta de especificidad de nuestra técnica, lo que resulta poco probable, ya

que como señalaremos más adelante, la especificidad obtenida en suero es del 100%.

Y por último, podría deberse a la existencia de la mutación de *BRAF* en este tipo tumoral, hasta ahora no descrita.

Estas consideraciones nos conducen a la necesidad de realizar, tanto un análisis más detallado en estos casos, como a un estudio con mayor número de pacientes.

Aunque como se ha referido, el LCR representaría hasta el momento la fuente que ofrece mejor rendimiento a la hora de realizar una aproximación a la caracterización molecular de los tumores cerebrales, diferentes estudios recientes han demostrado la capacidad de detectar diferentes aberraciones moleculares de estos tumores a partir de las bajas concentraciones de ácidos nucleicos detectados en **sangre**^{127,161}. Uno de los impulsos en seguir trabajando en el desarrollo y validación de técnicas que aumenten la sensibilidad de detección en este biofluido, es la mayor accesibilidad a la hora de extraer las muestras en comparación a los procedimientos de obtención de LCR, más invasivos y en ocasiones contraindicados según las características y el estado clínico del paciente. Este aspecto resulta de suma importancia en la práctica clínica habitual, más si cabe en el caso de pacientes pediátricos, en los que frecuentemente requieren ser sometidos a técnicas de sedación para poder llevar a cabo estos procedimientos.

Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que compara diferentes fuentes de biopsias líquidas en los cánceres pediátricos¹⁶².

Nuestros datos revelan que, la obtención de ADN circulante a partir de biofluidos sanguíneos, como el suero y el plasma, podría utilizarse para la detección de biomarcadores mediante dPCR en pacientes pediátricos.

Además, basándonos en nuestros resultados, **el ADN circulante derivado del suero representa con mayor precisión el estado mutacional de *BRAF* del tumor que el plasma, utilizando la comparación con los datos disponibles en el estudio de la biopsia sólida.**

Esta conclusión la inferimos de los datos de sensibilidad y la especificidad. En la detección de la mutación V600EBRAF en plasma, fueron de un 25% y 77,8% respectivamente, mientras que los mismos parámetros en suero resultaron de un 50% y un 100%.

Estos resultados deben ser interpretados con cautela, debido principalmente a que la cohorte analizada es pequeña.

Nuestros valores de sensibilidad de detección de BRAFV600E en biopsia líquida son ligeramente inferiores a los observados por otros autores en otras patologías¹⁶³, no existiendo datos sobre este valor en el análisis de tumores cerebrales.

Una posible explicación, es que estos tumores rara vez metastatizan fuera del SNC¹⁶⁴, por lo que el ctDNA liberado al torrente sanguíneo está restringido, y hace que la detección de alelos minoritarios sea más complejo¹⁶⁵.

Existen estudios de detección de la mutación V600E de *BRAF* en ADN circulante en población infantil, como es el caso de la histiocitosis de células de Langerhans (HCL) en la edad pediátrica. Héritier et al demuestra que, en los pacientes con HCL y afectación de al menos algún órgano de riesgo (hígado, bazo y médula ósea), BRAFV600E se podría detectar, mediante ddPCR en sangre, en el 100% de los casos. En aquellos niños con enfermedad multisistémica y sin afectación de órganos de riesgo se detectaría con significativamente menos frecuencia (42%), y únicamente en un 14% en aquellos con enfermedad localizada¹⁶⁶, generalmente a nivel cutáneo u óseo.

Li et al, realiza un análisis de BRAFV600E en biopsia líquida similar a nuestro estudio. Estudian la concordancia entre el estado mutacional

de *BRAF* en tejido y en ADN libre circulante en plasma en pacientes con carcinoma papilar de tiroides, mostrando unos datos de sensibilidad y especificidad para la técnica de dPCR en biopsia líquida similares a los nuestros: 61,54% y 90,91% respectivamente. Así mismo, hace referencia a las dificultades que han presentado otros grupos en poder detectar las mutaciones en sangre¹⁶⁷.

Aún a pesar de no alcanzar mayores niveles de sensibilidad, esta técnica podría resultar útil cuando no se dispone de una biopsia sólida y como herramienta de predicción de respuesta a terapia¹⁶⁸, como ha sido aprobado por la FDA y la EMA en pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas⁸⁹, en los que los valores obtenidos para las mutaciones de EGFR fueron 100% de especificidad y 65,7% de sensibilidad¹⁶⁹.

Otro aspecto a discutir, son los mejores resultados obtenidos en el presente estudio, en cuanto a sensibilidad y especificidad en suero respecto al plasma

Estos datos se deben interpretar con cautela debido al recortado número de pacientes a estudio, y también porque, hasta el momento, según otros grupos de investigación, el plasma se considera la fuente más óptima para estudios de biopsia líquida de forma global¹⁷⁰.

No obstante, hay que destacar de nuevo, que el presente estudio es el primero publicado que compara diferentes fuentes de biopsias líquidas en tumores cerebrales infantiles.

El **suero** es la fracción acelular de la sangre obtenida tras un proceso de coagulación y contiene agua, albúmina, globulinas, lipoproteínas, aminoácidos, enzimas, hormonas, compuestos nitrogenados, iones y ácidos nucleicos principalmente. El **plasma** es la fracción acelular de la sangre no sometida a ese proceso de coagulación, diferenciándose por tanto del suero por contener además fibrinógeno y otras proteínas de coagulación¹⁷¹.

Se describe que el proceso de coagulación origina cierta lisis del contenido leucocitario, produciendo un aumento de la proporción de ADN no tumoral de la muestra, es decir, una mayor concentración de ADN WT de fondo que dificultaría la detección de las mutaciones tumorales a estudio en suero en comparación al plasma¹⁷².

Pero hay que incidir en el hecho de que, el contenido de ADN circulante también aumenta si las condiciones de almacenamiento y procesamiento no son las óptimas, y que además, los métodos de extracción de ADN son pasos críticos que influyen en la eficiencia de su aislamiento, por lo que es fundamental aplicar escrupulosamente procesos preanalíticos estandarizados¹⁷³.

Además, existen estudios recientes que señalan una correlación entre la expresión de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) detectada en suero, y no así en plasma, en pacientes diagnosticados de glioblastoma, con la eficacia del tratamiento con antiangiogénicos¹⁷⁴.

Por todo ello, aunque la recomendación actual más general es el uso del plasma para detección de biomarcadores, ya que teóricamente representaría mejor el estado in-vivo que el suero, **no descartamos según los resultados obtenidos en nuestro estudio, que el suero resulte también una buena opción para el estudio de biopsia líquida.**

6. Posibilidad de determinación de otras mutaciones en biopsia líquida de niños con tumores cerebrales.

Como se ha revisado en el apartado introductorio de alteraciones moleculares en gliomas infantiles, además de la mutación puntual de *BRAF*, destaca de la fusión del gen **BRAF con KIAA1549** como mecanismo activador de la vía MAPK y diana terapéutica para los inhibidores de MEK^{62,67}.

El material genético óptimo en biopsia líquida para el estudio de genes fusión, es el mARN circulante derivado del tumor, pero su estructura monocatenaria le confiere una gran vulnerabilidad a la degradación en comparación al ctADN¹⁷⁵. Esta complejidad técnica añadida nos ha orientado a la detección de la mutación BRAFV600E en el presente estudio, pero supone un reto a conseguir en próximos proyectos, debido a la relevancia del gen de fusión como diana molecular para los inhibidores de MEK.

En cuanto a la posibilidad de detectar la **mutación H3K27M**, con importante valor pronóstico en gliomas infantiles y diana para futuros fármacos dirigidos⁸⁵, desafortunadamente no se pudo llevar a cabo con éxito en el presente estudio, debido a problemas derivados en la amplificación con las sondas específicas diseñadas para dPCR, constituyendo un objetivo a conseguir en próximos proyectos.

Recientemente, otros grupos han llevado a cabo estudios de detección de la mutación H3K27M en plasma y LCR de pacientes pediátricos con gliomas difusos. Un punto interesante a destacar en estos trabajos, es el aumento de ADN circulante y la capacidad de detección de la mutación en plasma en el periodo de seguimiento, tras la aplicación de terapias como la radioterapia, hecho que presumiblemente se debe a la alteración de la integridad de la BHE y la necrosis celular originada¹⁷⁶.

Todas estas consideraciones nos conducen a plantear una interesante secuencia de estudio para un futuro uso clínico de la biopsia líquida en tumores cerebrales: Un análisis inicial al diagnóstico del LCR, y, posteriormente, un análisis seriado de muestras de sangre, más accesibles, como método de seguimiento de la respuesta tumoral a las diferentes terapias.

7. Utilidad en la práctica clínica de nuestro estudio.

El análisis de la mutación BRAFV600E en ADN circulante aislado en suero, **identificaría un subconjunto de pacientes que podrían responder a fármacos inhibidores dirigidos**, a destacar los resultados obtenidos hasta el momento con dabrafenib¹⁷⁷ (como fue el observado en el paciente LI.31), mejorando así su pronóstico.

Además, debido a la inaccesibilidad de algunos tumores del SNC y la agresividad de la cirugía, la obtención de muestras sólidas para su análisis molecular está extraordinariamente limitado. El uso de las biopsias líquidas podría superar estas dificultades e influir no sólo en el tratamiento, sino también en el seguimiento de la enfermedad ¹⁷⁸, identificando mecanismos de resistencia durante la terapia o como método de control de progresión o recaída de la enfermedad¹⁷⁹.

El uso de la biopsia líquida para seguimiento de la evolución de los pacientes con tumores cerebrales de nuestra cohorte inicial, era un objetivo que se planteó en el diseño del estudio. Para ello, era necesario obtener muestras líquidas seriadas al diagnóstico y tras los diferentes tratamientos recibidos, como cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, así como en el momento de progresión de la enfermedad.

Esta cronología en la recogida de muestras no se pudo realizar en la mayoría de los casos, resultando ampliamente heterogénea en la cohorte inicial, no permitiendo realizar el análisis previsto de la detección del estado mutacional a lo largo de la evolución del tumor.

Para evitar el posible sesgo originado en el tiempo de recogida, sólo se analizaron las muestras disponibles de aquellos pacientes en los cuales la muestra líquida se obtuvo simultáneamente a la sólida¹⁸⁰.

Al haberse recogido la muestra de biopsia líquida de forma simultánea con la cirugía (realizada al diagnóstico o en momento de progresión), se homogeneizan las muestras en relación a la carga tumoral, siendo ésta la mayor disponible en cada paciente durante el tiempo del estudio. No obstante, hay que señalar que existían diferencias significativas en los volúmenes tumorales de los diferentes pacientes, hecho que influye en la cantidad de ADN circulante¹⁸¹.

CONCLUSIONES

Los tumores cerebrales suponen la primera causa tanto de mortalidad, como de secuelas a largo plazo en la población infantil afectada por cáncer. Esta importante morbimortalidad no sólo es secundaria a la propia enfermedad, sino también a las diferentes técnicas diagnósticas y a los tratamientos a los que se someten estos pacientes de naturaleza tan vulnerable.

Los tumores cerebrales infantiles difieren radicalmente, al igual que el resto de tumores sólidos, de los tumores del adulto. Los recientes avances en el estudio de las alteraciones moleculares subyacentes en estos tumores ponen de manifiesto estas diferencias, y abren un amplio campo de posibilidades terapéuticas mediante el uso de fármacos dirigidos, que evitarían los efectos secundarios no deseados del uso de las clásicas terapias, con efecto más indiscriminado.

No sólo resulta de suma importancia en el manejo clínico el conocimiento de esos biomarcadores, sino también el poder acceder a esa información de la manera más inocua posible para el paciente, así como obtenerla en tiempo real.

La biopsia líquida cumple esa doble función, y su aplicación en el estudio de neoplasias difícilmente accesibles como son los tumores del SNC, supondría un avance extraordinario en el manejo de estas patologías.

Esta innovadora técnica ha sido estudiada hasta el momento de manera mucho más exhaustiva en adultos que en niños, y además, en mucha menor medida en tumores cerebrales con respecto a tumores en otras localizaciones. Es por ello que, el presente estudio, ofrece información

valiosa para el futuro desarrollo de la biopsia líquida en este subgrupo de pacientes.

Universalmente, para conseguir la aplicación de una nueva técnica en la práctica clínica habitual, es preciso asegurar una adecuada exactitud diagnóstica que permita ofrecer seguridad en la toma de decisiones terapéuticas basadas en la información obtenida.

En el caso de las biopsias líquidas, este objetivo de alcanzar una alta precisión en la detección de biomarcadores, resulta ser uno de los principales desafíos a los que se enfrenta su validación y al cual nos hemos enfrentado en este trabajo de investigación.

Cada biomarcador es único, y cada uno de ellos requiere un extenso y complejo trabajo de análisis de los diferentes métodos de detección según el material y la fuente utilizada.

En el presente estudio, el suero se presenta como la alternativa más prometedora para la detección de la mutación BRAFV600E mediante dPCR en biopsia líquida, en comparación al plasma, en pacientes pediátricos con tumores del SNC.

En cuanto al estudio del LCR, debido a la falta de muestras derivada de la menor accesibilidad en su obtención, no se ha podido realizar el análisis programado para así poder extraer conclusiones, y se requieren más estudios que aumenten el número de ctDNA derivado de este biofluido.

El disponer de esta técnica para su uso en la práctica clínica sería de gran interés por su gran potencial en el manejo de los pacientes.

Para ello es preciso una validación más robusta mediante el estudio de un mayor número de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. (2015). *Cancer: Principles & Practice of Oncology. Primer of the Molecular Biology of Cancer*. 2nd edition. Wolters Kluwer Health.
2. Singer C, Long E. *Fascimile of Benivieni's: De Abditis Nonnullis Ac Mirandis Morborum et Sanationum Causis*. (1954). 1st edition. (Charles C Thomas, ed.).
3. Tweel JG va. den. (2019) Famous books in the history of pathology. *Pol J Pathol*, 70(1):1-6. doi:10.5114/pjp.2019.84454
4. Laín Entralgo P. (1978). *Historia de La Medicina*. Primera ed. (Editores SALVAT, ed.).
5. Ribatti D. (2018). An historical note on the cell theory. *Exp Cell Res*, 364(1):1-4. doi:10.1016/j.yexcr.2018.01.038
6. Chvátal A, Verkhatsky A. (2018). An Early History of Neuroglial Research: Personalities. *Neuroglia*, 1(1):245-281. doi: 10.3390/neuroglia 1010016
7. Kaye AH, Morokoff A. (2014). The continuing evolution: Biology and treatment of brain tumors. *Neurosurgery*, 61(1):100-104. doi:10.1227/NEU.0000000000000388
8. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
9. Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The Hallmarks of Cancer Review Douglas. *Cell*, 100(7):57-70.
10. Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
11. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder-carcinoma oncogene. *Nature*, 300(11):149-152. doi:10.1038/300149a0
12. F.S. Collins, E.S. Lander, J. Rogers et al. (2004). International Human Genome Sequencing Consortium, Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011):931-945.
13. International HapMap Consortium. (2003). The International HapMap Project. *Nature*, 426(6968):789-796.
14. Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, et al. (2018). Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*, 174(4):1034-1035. doi:10.1016/j.cell.2018.07.034
15. Hudson TJ, Anderson W, Aretz A, et al. (2010). International network of cancer genome projects. *Nature*, 464(7291):993-998. doi:10.1038/nature08987

16. Nakagawa H, Fujita M. (2018). Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. *Cancer Sci*, 109(3):513-522. doi:10.1111/cas.13505
17. Stewart, Bernard W. Wild CP. *World Cancer Report 2014.*; Published online <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>
18. Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, et al. (2018). The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*, 555 (7696):321-327. doi:10.1038/nature25480
19. Forrest SJ, Georger B, Janeway KA. (2018). Precision medicine in pediatric oncology. *Curr Opin Pediatr*, 30(1):17-24. doi:10.1097/ MOP. 0000000000000570
20. Omuro A, DeAngelis LM. (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. *JAMA - J Am Med Assoc*, 310(17):1842-1850. doi:10.1001/jama.2013.280319
21. Ferguson S, Lesniak MS. (2005). Percival Bailey and the classification of brain tumors. *Neurosurg Focus*, 18(4):1-6. doi: 10.3171/ foc. 2005.18.4.8
22. Stucklin ASG, Ramaswamy V, Daniels C, Taylor MD. (2018). Review of molecular classification and treatment implications of pediatric brain tumors. *Curr Opin Pediatr*, 30(1):3-9. doi: 10.1097/ MOP. 000 000000000562
23. Horbinski C, Ligon KL, Brastianos P, et al. (2019). The medical necessity of advanced molecular testing in the diagnosis and treatment of brain tumor patients. *Neuro Oncol*, 21(12):1498-1508. doi:10.1093/ neuonc/noz119
24. Pizzo PA, Poplack DG. (2016). *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Seventh Ed. (Pizzo PA, Poplack DG, Adamson PC, Blaney SM, Helman LJ, eds.). Wolters Kluwer Health.
25. Diamandis P, Aldape K. (2018). World Health Organization 2016 Classification of Central Nervous System Tumors. *Neurol Clin*, 36(3):439-447. doi:10.1016/j.ncl.2018.04.003
26. Jaimes C, Poussaint TY. (2019). Primary Neoplasms of the Pediatric Brain. *Radiol Clin North Am*, 57(6):1163-1175. doi: 10.1016/ j.rcl. 2019.06.004
27. Pollack IF, Agnihotri S, Broniscer A. (2019). Childhood brain tumors: Current management, biological insights, and future directions. *J Neurosurg Pediatr*, 23(3):261-273. doi:10.3171/2018.10.PEDS18377
28. Johnson KJ, Cullen J, Barnholtz-Sloan JS, et al. (2014). Childhood brain tumor epidemiology: A brain tumor epidemiology consortium review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23(12):2716-2736. doi: 10.1158 /1055-9965.EPI-14-0207
29. RETI-SEHOP. Informe del Registro Español de Tumores Infantiles. Estadísticas de cáncer infantil en España. 1980-2017. Published online 2018:117. <https://www.uv.es/rnti/informes.html>
30. Abdel-Baki MS, Hanzlik E, Kieran MW. (2015). Multidisciplinary pediatric brain tumor clinics: the key to successful treatment? *CNS Oncol*, 4(3):147-155. doi:10.2217/cns.15.1

31. Udaka YT, Packer RJ. (2018). Pediatric Brain Tumors. *Neurol Clin*, 36(3):533-556. doi:10.1016/j.ncl.2018.04.009
32. Bleeker FE, Hopman SMJ, Merks JHM, Aalfs CM, Hennekam RCM. (2014). Brain tumors and syndromes in children. *Neuropediatrics*, 45(3):137-161. doi:10.1055/s-0034-1368116
33. Zhang J, Walsh MF, Wu G, et al. (2015). Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *N Engl J Med*, 373(24):2336-2346. doi:10.1056/nejmoa1508054
34. Ostrom QT, Fahmideh MA, Cote DJ, et al. (2019). Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. *Neuro Oncol*, 21(11):1357-1375. doi:10.1093/neuonc/noz123
35. Barnholtz-Sloan JS, Ostrom QT, Cote D. (2018). Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin*, 36(3):395-419. doi:10.1016/j.ncl.2018.04.001
36. Jones DTW, Kieran MW, Bouffet E, et al. (2018). Pediatric low-grade gliomas: Next biologically driven steps. *Neuro Oncol*, 20(2):160-173. doi:10.1093/neuonc/nox141
37. Guerreiro Stucklin AS, Tabori U, Grotzer MA. (2016). The Changing Landscape of Pediatric Low-Grade Gliomas: Clinical Challenges and Emerging Therapies. *Neuropediatrics*, 47(2):70-83. doi:10.1055/s-0035-1570491
38. Buczkowicz P, Hawkins C. (2015). Pathology, molecular genetics, and epigenetics of diffuse intrinsic pontine glioma. *Front Oncol*, 5(Jun):1-9. doi:10.3389/fonc.2015.00147
39. Klonou A, Piperi C, Gargalionis AN, Papavassiliou AG. (2017). Molecular Basis of Pediatric Brain Tumors. *NeuroMolecular Med*, 19(2-3):256-270. doi:10.1007/s12017-017-8455-9
40. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. (2015). Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*, 129(6):829-848. doi:10.1007/s00401-015-1432-1
41. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al. (2015). CBTRUS statistical Report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*, 17:iv1-iv62. doi:10.1093/neuonc/nov189
42. Sturm D, Pfister SM, Jones DTW. (2017). Pediatric gliomas: Current concepts on diagnosis, biology, and clinical management. *J Clin Oncol*, 35(21):2370-2377. doi:10.1200/JCO.2017.73.0242
43. Bandopadhyay P, Bergthold GL, Wendy Goumnerova LCMLM, et al. (2014). Long-term outcome of 4,040 children diagnosed with pediatric low-grade gliomas: an analysis of the Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) database. *Pediatr Blood Cancer*, 61(7):1173-1179. doi:10.1002/pbc.24958
44. Himes BT, Zhang L, Daniels DJ. (2019). Treatment strategies in diffuse midline gliomas with the H3K27M mutation: The role of convection-enhanced delivery in overcoming anatomic challenges. *Front Oncol*, 9(Feb). doi:10.3389/fonc.2019.00031

45. Ma X, Liu Y, Liu Y, et al. (2018). Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature*, 555(7696):371-376. doi:10.1038/nature25795
46. Jones DTW, Banito A, Grünwald TGP, et al. (2019). Molecular characteristics and therapeutic vulnerabilities across paediatric solid tumours. *Nat Rev Cancer*, 19(8):420-438. doi:10.1038/s41568-019-0169-x
47. Bornhorst M, Hwang EI. (2020). Molecularly Targeted Agents in the Therapy of Pediatric Brain Tumors. *Pediatr Drugs*, 22(1):45-54. doi:10.1007/s40272-019-00369-z
48. Gajjar A, Bowers DC, Karajannis MA, Leary S, Witt H, Gottardo NG. (2015). Pediatric brain tumors: Innovative genomic information is transforming the diagnostic and clinical landscape. *J Clin Oncol*, 33(27):2986-2998. doi:10.1200/JCO.2014.59.9217
49. Glod J, Rahme GJ, Kaur H, Raabe EH, Hwang EI, Israel MA. (2016). Pediatric brain tumors: Current knowledge and therapeutic opportunities. *J Pediatr Hematol Oncol*, 38(4):249-260. doi:10.1097/MPH.0000000000000551
50. Northcott PA, Pfister SM, Jones DTW. (2015). Next-generation (epi)genetic drivers of childhood brain tumours and the outlook for targeted therapies. *Lancet Oncol*, 16(6):e293-e302. doi:10.1016/S1470-2045(14)71206-9
51. Kline CN, Joseph NM, Grenert JP, et al. (2017). Targeted next-generation sequencing of pediatric neuro-oncology patients improves diagnosis, identifies pathogenic germline mutations, and directs targeted therapy. *Neuro Oncol*, 19(5):699-709. doi:10.1093/neuonc/now254
52. Liu KW, Pajtler KW, Worst BC, Pfister SM, Wechsler-Reya RJ. (2017). Molecular mechanisms and therapeutic targets in pediatric brain tumors. *Sci Signal*, 10(470). doi:10.1126/scisignal.aaf7593
53. Johann PD, Erkek S, Zapatka M, et al. (2016). Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors Are Comprised of Three Epigenetic Subgroups with Distinct Enhancer Landscapes. *Cancer Cell*, 29(3):379-393. doi: 10.1016/j.ccell.2016.02.001
54. Waker CA, Lober RM. (2019). Brain Tumors of Glial Origin. *Adv Exp Med Biol*;1190:281-297. doi:10.1007/978-981-32-9636-7_18
55. Ryall S, Zapotocky M, Fukuoka K, et al. (2020). Integrated Molecular and Clinical Analysis of 1,000 Pediatric Low-Grade Gliomas. *Cancer Cell*;37(4):569-583.e5. doi:10.1016/j.ccell.2020.03.011
56. Sievert AJ, Lang SS, Boucher KL, et al. (2013). Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(15):5957-5962. doi:10.1073/pnas.1219232110
57. Toll SA, Tran HN, Cotter J, et al. (2019). Sustained Response of Three Pediatric BRAF V600E Mutated High-Grade Gliomas to Combined BRAF and MEK Inhibitor Therapy. Vol 10.; www.oncotarget.com

58. Carlino MS, Long G V., Kefford RF, Rizos H. (2015). Targeting oncogenic BRAF and aberrant MAPK activation in the treatment of cutaneous melanoma. *Crit Rev Oncol Hemato*, 96(3):385-398. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.08.021
59. Schindler G, Capper D, Meyer J, et al. (2011). Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol*, 121(3):397-405. doi:10.1007/s00401-011-0802-6
60. Lobbous M, Bernstock JD, Coffee E, et al. (2020). An update on neurofibromatosis type 1-associated gliomas. *Cancers (Basel)*, 12(1):1-15. doi:10.3390/cancers12010114
61. Ryall S, Tabori U, Hawkins C. (2020). Pediatric low-grade glioma in the era of molecular diagnostics. *Acta Neuropathol Commun*, 8(1):1-22. doi:10.1186/s40478-020-00902-z
62. Jeuken JW, Wesseling P. (2010). MAPK pathway activation through BRAF gene fusion in pilocytic astrocytomas; A novel oncogenic fusion gene with diagnostic, prognostic, and therapeutic potential. *J Pathol*, 222(4):324-328. doi:10.1002/path.2780
63. da Silva RC, de Paula HSC, Leal CBQS, et al. (2015). BRAF overexpression is associated with BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinomas. *Genet Mol Res*, 14(2): 5065-5075. doi: 10.4238/2015.May.12.9
64. Lassaletta A, Zapotocky M, Mistry M, et al. (2017). Therapeutic and Prognostic Implications of BRAF V600E in Pediatric Low-Grade Gliomas. *J Clin Oncol*, 35:2934-2941. doi:10.1200/JCO
65. Bufalo F del, Carai A, Fig-Talamanca LS, et al. (2014). Response of recurrent BRAFV600E mutated ganglioglioma to Vemurafenib as single agent. *J Transl Med*, 12(1):1-7. doi:10.1186/s12967-014-0356-1
66. Sanchez JN, Wang T, Cohen MS. (2018). BRAF and MEK Inhibitors: Use and Resistance in BRAF-Mutated Cancers. *Drugs*, 78(5):549-566. doi:10.1007/s40265-018-0884-8
67. Schreck KC, Grossman SA, Pratilas CA. (2019). BRAF mutations and the utility of RAF and MEK inhibitors in primary brain tumors. *Cancers (Basel)*, 11(9). doi:10.3390/cancers11091262
68. Mittapalli RK, Vaidhyanathan S, Dudek AZ, Elmquist WF. (2013). Mechanisms limiting distribution of the threonine-protein kinase B-RaF V600E inhibitor dabrafenib to the brain: Implications for the treatment of melanoma brain metastases. *J Pharmacol Exp Ther*, 344(3):655-664. doi:10.1124/jpet.112.201475
69. Safaee Ardekani G, Jafarnejad SM, Tan L, Saeedi A, Li G. (2012). The Prognostic Value of BRAF Mutation in Colorectal Cancer and Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 7(10). doi:10.1371/journal.pone.0047054
70. Markham A, Keam SJ. (2020). Selumetinib: First Approval. *Drug*, 80(9):931-937. doi:10.1007/s40265-020-01331-x

71. Fangusaro J, Onar-Thomas A, Young Poussaint T, et al. (2019). Selumetinib in paediatric patients with BRAF-aberrant or neurofibromatosis type 1-associated recurrent, refractory, or progressive low-grade glioma: a multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 20(7):1011-1022. doi:10.1016/S1470-2045(19)30277-3
72. De Blank P, Bandopadhyay P, Haas-Kogan D, Fouladi M, Fangusaro J. (2019). Management of pediatric low-grade glioma. *Curr Opin Pediatr*, 31(1):21-27. doi:10.1097/MOP.0000000000000717
73. Karajannis MA, Legault G, Fisher MJ, et al. (2014). Phase II study of sorafenib in children with recurrent or progressive low-grade astrocytomas. *Neuro Oncol*, 16(10):1408-1416. doi:10.1093/neuonc/nou059
74. Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, Mueller S, Haas-Kogan D. (2017). Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J Neurooncol*, 134(3):541-549. doi:10.1007/s11060-017-2393-0
75. Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*, 482(7384):226-231. doi: 10.1038/nature 10833
76. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, et al. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet*, 44(3):251-253. doi:10.1038/ng.1102
77. Rizzo D, Ruggiero A, Martini M, Rizzo V, et al. (2015). Molecular Biology in Pediatric High-Grade Glioma: Impact on Prognosis and Treatment. *Biomed Res Int*, 2015. doi:10. 1155/2015/215135
78. Mackay A, Burford A, Carvalho D, et al. (2017). Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell*, 32(4):520-537.e5. doi:10.1016/j.ccell. 2017.08. 017
79. Kasper LH, Baker SJ. (2020). Invited Review: Emerging functions of histone H3 mutations in paediatric diffuse high-grade gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 46(1):73-85. doi:10.1111/nan.12591
80. Fontebasso AM, Papillon-Cavanagh S, Schwartzentruber J, et al. (2014). Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nat Genet*, 46(5): 462-466. doi: 10.1038/ng.2950
81. Vanan MI, Eisenstat DD. (2014). Management of high-grade gliomas in the pediatric patient: Past, present, and future. *Neuro-Oncology Pract*, 1(4):145-157. doi:10.1093/nop/npu022
82. Khan DA, Laghari AA, Bari ME, Shamim MS. (2019). Treatment options for paediatric brainstem gliomas. *J Pak Med Assoc*, 69(9):1400-1402.
83. Lin GL, Wilson KM, Ceribelli M, et al. (2020). Throughput Combination Drug Screening. *Sci Transl Med*, 11(519):1-29. doi:10.1126/scitranslmed.aaw0064.Therapeutic

84. Gal AA. (2001). *In Search of the Origins of Modern Surgical Pathology*. <https://journals.lww.com/anatomicpathology>
85. Long W, Yi Y, Chen S, Cao Q, Zhao W, Liu Q. (2017). Potential new therapies for pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *Front Pharmacol*, 8(Jul). doi:10.3389/fphar.2017.00495
86. Tisnado J, Young R, Peck KK, Haque S. (2016). Conventional and advanced imaging of diffuse intrinsic pontine glioma. *J Child Neurol*, 31(12):1386-1393. doi:10.1177/0883073816634855
87. Kosnik Infinger L, Stevenson CB. (2016). *Current Neuropharmacology*, 15(1) 129-133. doi:10.2174/1570159X14666160425114
88. Abbou SD, Shulman DS, DuBois SG, Crompton BD. (2019). Assessment of circulating tumor DNA in pediatric solid tumors: The promise of liquid biopsies. *Pediatr Blood Cancer*, 66(5). doi:10.1002/pbc.27595
89. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, et al. (2018). Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther Adv Med Oncol*, 10. doi:10.1177/1758835918794630
90. Reimers N, Pantel K. (2019). Liquid biopsy: Novel technologies and clinical applications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol 57. De Gruyter:312-316. doi:10.1515/cclm-2018-0610
91. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, et al. (2015). Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun*, 6. doi:10.1038/ncomms9839
92. Stallard S, Savelieff MG, Wierzbicki K, et al. (2018). CSF H3F3A K27M circulating tumor DNA copy number quantifies tumor growth and in vitro treatment response. *Acta Neuropathol Commun*, 6(1):80. doi:10.1186/s40478-018-0580-7
93. Van Paemel R, Vlug R, De Preter K, et al. (2020). The pitfalls and promise of liquid biopsies for diagnosing and treating solid tumors in children: a review. *Eur J Pediatr*, 179(2):191-202. doi:10.1007/s00431-019-03545-y
94. Fontanilles M, Duran-Peña A, Idbaih A. (2018). Liquid Biopsy in Primary Brain Tumors: Looking for Stardust! *Curr Neurol Neurosci Rep*, 18(3). doi:10.1007/s11910-018-0820-z
95. Sawyers CL. (2008). The cancer biomarker problem. *Nature*, 452(7187): 548-552. doi:10.1038/nature06913
96. Saini S. (2016). PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol*, 39(2):97-106. doi:10.1007/s13402-016-0268-6
97. Silsirivanit A. (2019). *Glycosylation Markers in Cancer*. *Adv Clin Chem*, 89:189-213. doi: 10.1016/bs.acc.2018.12.005 2019.
98. Mandel P, Metais P. (1948). Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *Comptes rendus des séances la Société Biol ses Fil*, Feb:142-241.
99. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, et al. (1996). Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med*, 2(9):1033-1035. doi:10.1038/nm0996-1033

100. Garcia-Romero N, Esteban-Rubio S, Rackov G, Carrión-Navarro J, Belda-Iniesta C, Ayuso-Sacido A. (2018). Extracellular vesicles compartment in liquid biopsies: Clinical application. *Mol Aspects Med*, 60:27-37. doi:10.1016/j.mam.2017.11.009
101. Sorber L, Zwaenepoel K, Jacobs J, et al. (2019). Circulating cell-free DNA and RNA analysis as liquid biopsy: Optimal centrifugation protocol. *Cancers (Basel)*, 11(4). doi:10.3390/cancers11040458
102. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(9):531-548. doi:10.1038/nrclinonc.2017.14
103. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*, 14(9):985-990. doi:10.1038/nm.1789
104. Pathan M, Fonseka P, Chitti S V., et al. (2019). Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res*, 47 (D1):D516-D519. doi:10.1093/nar/gky1029
105. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 61(4):1659-1665.
106. Jacobus A, Wentzel JF, Aucamp J, Dyk E Van, Pretorius PJ. (2016). Biochimica et Biophysica Acta Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *BBA - Mol Cell Res*, 1863(1):157-165. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.10.022
107. Leon. (1977). Free DNA serum cancer patient.
108. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*, 35(3):347-376. doi:10.1007/s10555-016-9629-x
109. Hoffman LM, DeWire M, Ryall S, et al. (2016). Spatial genomic heterogeneity in diffuse intrinsic pontine and midline high-grade glioma: implications for diagnostic biopsy and targeted therapeutics. *Acta Neuropathol Commun*, 4:1. doi:10.1186/s40478-015-0269-0
110. Logothetis CJ. (2013). Re: Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *Eur Urol*, 64(1):170. doi:10.1016/j.eururo.2013.04.025
111. Chicard M, Colmet-Daage L, Clement N, et al. (2018). Whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals temporo-spatial heterogeneity and identifies treatment-resistant clones in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 24(4):939-949. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1586
112. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. (2018). Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American society of clinical oncology and college of American pathologists joint review. *J Clin Oncol*, 36(16):1631-1641. doi:10.1200/JCO.2017.76.8671
113. Jenkins S, Yang JCH, Ramalingam SS, et al. (2017). Plasma ctDNA Analysis for Detection of the EGFR T790M Mutation in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 12(7):1061-1070. doi:10.1016/j.jtho.2017.04.003

114. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. (2019). Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet*, 20(2):71-88. doi:10.1038/s41576-018-0071-5
115. Ching T, Duncan ME, Newman-Eerkes T, et al. (2020). Analytical evaluation of the clonoSEQ Assay for establishing measurable (minimal) residual disease in acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, and multiple myeloma. *BMC Cancer*, 20(1):1-15. doi:10.1186/s12885-020-07077-9
116. Gupta R, Othman T, Chen C, Sandhu J, Ouyang C, Fakih M. (2020). Guardant360 Circulating Tumor DNA Assay Is Concordant with FoundationOne Next-Generation Sequencing in Detecting Actionable Driver Mutations in Anti-EGFR Naive Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist*, 25(3):235-243. doi:10.1634/theoncologist.2019-0441
117. Weiser DA, West-Szymanski DC, Frint E, et al. (2019). Progress toward liquid biopsies in pediatric solid tumors. *Cancer Metastasis Rev*, 38(4):553-571. doi:10.1007/s10555-019-09825-1
118. National Library of Medicine (U.S.). Use of Specific Genetic Alterations of Tumoral Cells Identified by NGS to Follow Peripheral Samples of Children With Metastatic and/or High Risk Solid Tumor. ClinicalTrials.gov. doi:Identifier: NCT02546453
119. National Library of Medicine (U.S.). Biological Characterisation of High Risk Childhood Cancer in Children, Adolescents and Young Adults (MICCHADO). doi:Identifier: NCT03496402
120. National Library of Medicine (U.S.). Precision Medicine for Children With Cancer (PRISM). doi:Identifier: NCT03336931
121. Klega K, Imamovic-Tuco A, Ha G, et al. (2018). Detection of Somatic Structural Variants Enables Quantification and Characterization of Circulating Tumor DNA in Children With Solid Tumors. *JCO Precis Oncol*, (2):1-13. doi:10.1200/po.17.00285
122. Combaret V, Hogarty MD, London WB, et al. (2009). Influence of neuroblastoma stage on serum-based detection of MYCN amplification. *Pediatr Blood Cancer*, 53(3):329-331. doi:10.1002/pbc.22009
123. Combaret V, Iacono I, Bellini A, et al. (2015). Detection of tumor ALK status in neuroblastoma patients using peripheral blood. *Cancer Med*, 4(4):540-550. doi:10.1002/cam4.414
124. Allegretti M, Casini B, Mandoj C, et al. (2018). Precision diagnostics of Ewing's sarcoma by liquid biopsy: circulating EWS-FLI1 fusion transcripts. *Ther Adv Med Oncol*, 10:1-9. doi:10.1177/1758835918774337
125. Mussolin L, Burnelli R, Pillon M, et al. (2013). Plasma Cell-Free DNA in Paediatric Lymphomas. *J Cancer*, 4(4):323-329. doi:10.7150/jca.6226
126. Ueno-Yokohata H, Okita H, Nakasato K, et al. (2018). Preoperative diagnosis of clear cell sarcoma of the kidney by detection of BCOR internal tandem duplication in circulating tumor DNA. *Genes Chromosom Cancer*, 57(10):525-529. doi:10.1002/gcc.22648

127. Connolly ID, Li Y, Gephart MH, Nagpal S. (2016). The “Liquid Biopsy”: the Role of Circulating DNA and RNA in Central Nervous System Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 16(3):1-8. doi:10.1007/s11910-016-0629-6
128. Balaña C, Ramirez JL, Taron M, et al. (2003). O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-l-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*, 9(4):1461-1468.
129. Yan W, Xu T, Zhu H, Yu J. (2020). Clinical applications of cerebrospinal fluid circulating tumor DNA as a liquid biopsy for central nervous system tumors. *Onco Targets Ther*, 13:719-731. doi:10.2147/OTT.S229562
130. Postel M, Roosen A, Laurent-Puig P, Taly V, Wang-Renault SF.(2018). Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Rev Mol Diagn*, 18(1):7-17. doi:10.1080/14737159.2018.1400384
131. García-Romero N, González-Tejedo C, Carrión-Navarro J, et al. (2016). Cancer stem cells from human glioblastoma resemble but do not mimic original tumors after in vitro passaging in serum-free media. *Oncotarget*, 7(40):65888-65901. doi:10.18632/oncotarget.11676
132. García-Romero N, Carrión-Navarro J, Esteban-Rubio S, et al. (2017). DNA Sequences within Glioma-Derived Extracellular Vesicles Can Cross the Intact Blood-Brain Barrier and Be Detected in Peripheral Blood of Patients. *Oncotarget*, Jan 3;8(1):1416-1428. doi: 10.18632/oncotarget.13635
133. García-Romero N, Rackov G, Belda-Iniesta C, Ayuso-Sacido Á. (2017). The Use of Peripheral Extracellular Vesicles for Identification of Molecular Biomarkers in a Solid Tumor Mouse Model. *Methods Mol Biol*, 1660:397-406. doi:10.1007/978-1-4939-7253-1_33
134. Schreck KC, Guajardo A, Lin DDM, Eberhart CG, Grossman SA. (2018). Concurrent BRAF/MEK inhibitors in BRAF V600-Mutant high-grade primary brain tumors. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*, 16(4):343-347. doi:10.6004/jnccn.2017.7052
135. Ceccon G, Werner JM, Dunkl V, et al. (2018). Dabrafenib treatment in a patient with an epithelioid glioblastoma and BRAF V600E mutation. *Int J Mol Sci*, 19(4):1-7. doi:10.3390/ijms19041090
136. Gojo J, Pavelka Z, Zapletalova D, et al. (2020). Personalized Treatment of H3K27M-Mutant Pediatric Diffuse Gliomas Provides Improved Therapeutic Opportunities. *Front Oncol*, 9(January):1-14. doi:10.3389/fonc.2019.01436
137. Wierzbicki K, Ravi K, Franson A, et al. (2020). Targeting and Therapeutic Monitoring of H3K27M-Mutant Glioma. *Curr Oncol Rep*, 22(2):1-15. doi:10.1007/s11912-020-0877-0

138. Krishnatry R, Zhukova N, Guerreiro Stucklin AS, et al. (2016). Clinical and treatment factors determining long-term outcomes for adult survivors of childhood low-grade glioma: A population-based study. *Cancer*, 122(8):1261-1269. doi:10.1002/cncr.29907
139. Milbury CA, Zhong Q, Lin J, et al. (2014). Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. *Biomol Detect Quantif*, 1(1):8-22. doi:10.1016/j.bdq.2014.08.001
140. Green AL, Kieran MW. (2015). Pediatric Brainstem Gliomas: New Understanding Leads to Potential New Treatments for Two Very Different Tumors. *Curr Oncol Rep*, 17(3). doi:10.1007/s11912-014-0436-7
141. Poulet G, Massias J, Taly V. (2019). Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol*, 63(6):449-455. doi:10.1159/000499337
142. Grölz D, Hauch S, Schlumpberger M, et al. (2018). Liquid Biopsy Preservation Solutions for Standardized Pre-Analytical Workflows Venous Whole Blood and Plasma. *Curr Pathobiol Rep*, 6(4):275-286. doi:10.1007/s40139-018-0180-z
143. Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B, Carter BS. (2017). Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn*, 17(10):943-947. doi:10.1080/14737159.2017.1374854
144. van Bussel MTJ, Pluim D, Bol M, Beijnen JH, Schellens JHM, Brandsma D. (2018). EpCAM-based assays for epithelial tumor cell detection in cerebrospinal fluid. *J Neurooncol*, 137(1):1-10. doi:10.1007/s11060-017-2691-6
145. Bailey P, Martin S. (2019). Insights on CTC Biology and Clinical Impact Emerging from Advances in Capture Technology. *Cells*, 8(6):553. doi:10.3390/cells8060553
146. Saenz-Antoñanzas A, Auzmendi-Iriarte J, Carrasco-Garcia E, et al. Liquid biopsy in glioblastoma: Opportunities, applications and challenges. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7). doi:10.3390/cancers 11070 950
147. Elazezy M, Joosse SA. (2018). Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J*, 16:370-378. doi:10.1016/j.csbj.2018.10.002
148. Mehrotra M, Singh RR, Loghavi S, et al. (2018). Detection of somatic mutations in cell-free DNA in plasma and correlation with overall survival in patients with solid tumors. *Oncotarget*, 9(12):10259-10271. doi:10.18632/oncotarget.21982
149. Bonner ER, Bornhorst M, Packer RJ, Nazarian J. (2018). Liquid biopsy for pediatric central nervous system tumors. *npj Precis Oncol*, 2(1):1-9. doi:10.1038/s41698-018-0072-z
150. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, et al. (2012). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem*, 84(2):1003-1011. doi:10.1021/ ac202 578x
151. Perkins G, Lu H, Garlan F, Taly V. (2017). Droplet-Based Digital PCR: Application in Cancer Research. *Adv Clin Chem*. 79:43-91. doi:10.1016/bs.acc.2016.10.001

152. Williams R, Peisajovich SG, Miller OJ, Magdassi S, Tawfik DS, Griffiths AD. (2006). Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nat Methods*, 3(7):545-550. doi:10.1038/nmeth896
153. Kurzrock R, Schwaederle MC, Husain H, et al. (2015). Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor DNA assay. *J Clin Oncol*, 33(15_suppl):11004-11004. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.11004
154. Cimmino F, Lasorsa VA, Vetrella S, Iolascon A, Capasso M. (2020). A Targeted Gene Panel for Circulating Tumor DNA Sequencing in Neuroblastoma. *Front Oncol*, 10(December):1-9. doi:10.3389/fonc.2020.596191
155. Stewart CM, Tsui DWY. (2018). Circulating cell-free DNA for non-invasive cancer management. *Cancer Genet*, 228-229:169-179. doi:10.1016/j.cancergen.2018.02.005
156. Behling F, Barrantes-Freer A, Skardelly M, et al. (2016). Frequency of BRAF V600E mutations in 969 central nervous system neoplasms. *Diagn Pathol*, 11(1). doi:10.1186/s13000-016-0506-2
157. Ding C, Tihan T. (2019). Recent progress in the pathology and genetics of pilocytic and pilomyxoid astrocytomas. *Balkan Med J*, 36(1):3-11. doi:10.4274/balkanmedj.2018.1001
158. Wang Y, Springer S, Zhang M, et al. (2015). Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(31):9704-9709. doi:10.1073/pnas.1511694112
159. Pentsova EI, Shah RH, Tang J, et al. (2016). Evaluating cancer of the central nervous system through next-generation sequencing of cerebrospinal fluid. *J Clin Oncol*, 34(20):2404-2415. doi:10.1200/JCO.2016.66.6487
160. Huang TY, Piunti A, Lulla RR, et al. (2017). Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathol Commun*, 5(1):28. doi:10.1186/s40478-017-0436-6
161. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, 6(224). doi:10.1126/scitranslmed.3007094
162. Andersson D, Fagman H, Dalin MG, Ståhlberg A. (2020). Circulating cell-free tumor DNA analysis in pediatric cancers. *Mol Aspects Med*, 72. doi:10.1016/j.mam.2019.09.003
163. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. (2014). Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med*, 20(4):430-435. doi:10.1038/nm.3511
164. Frühwald MC, Rutkowski S. (2011). ZNS-tumoren bei kindern und jugendlichen. *Dtsch Arztebl*, 108 (22):390-397. doi:10.3238/arztebl.2011.0390
165. Vymetalkova V, Cervena K, Bartu L, Vodicka P. (2018). Circulating cell-free dna and colorectal cancer: A systematic review. *Int J Mol Sci*, 19(11). doi:10.3390/ijms19113356

166. Héritier S, Hélias-Rodzewicz Z, Lapillonne H, et al. (2017). Circulating cell-free BRAFV600E as a biomarker in children with Langerhans cell histiocytosis. *Br J Haematol*, 178(3):457-467. doi:10.1111/bjh.14695
167. Li H, Zhao J, Zhang J, et al. Detection of ctDNA in the plasma of patients with papillary thyroid carcinoma. (2019). *Exp Ther Med*. Published online: 3389-3396. doi:10.3892/etm.2019.7997
168. Pasini L, Ulivi P. (2019). Liquid Biopsy for the Detection of Resistance Mechanisms in NSCLC: Comparison of Different Blood Biomarkers. *J Clin Med*, 8(7):998. doi:10.3390/jcm8070998
169. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al. (2014). First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: A phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer*, 110(1):55-62. doi:10.1038/bjc.2013.721
170. Pittella-Silva F, Chin YM, Chan HT, et al. (2020). Plasma or Serum: Which Is Preferable for Mutation Detection in Liquid Biopsy? *Clin Chem*, 66(7):946-957. doi:10.1093/clinchem/hvaa103
171. Lima-Oliveira G, Monneret D, Guerber F, Guidi GC. (2018). Sample management for clinical biochemistry assays: Are serum and plasma interchangeable specimens? *Crit Rev Clin Lab Sci*, 55(7):480-500. doi:10.1080/10408363.2018.1499708
172. Chan KCA, Yeung S-W, Lui W-B, Rainer TH, Lo YMD. (2005). Effects of Preanalytical Factors on the Molecular Size of Cell-Free DNA in Blood. *Clin Chem*, 51(4):781-784. doi:10.1373/clinchem.2004.046219
173. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. (2003). Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples [5]. *Clin Chem*, 49(6):1028-1029. doi:10.1373/49.6.1028
174. García-Romero N, García-Romero N, Palacín-Aliana I, et al. (2020). Bevacizumab dose adjustment to improve clinical outcomes of glioblastoma. *BMC Med*, 18(1):1-16. doi:10.1186/s12916-020-01610-0
175. Zaporozhchenko IA, Ponomaryova AA, Rykova EY, Laktionov PP. (2018). The potential of circulating cell-free RNA as a cancer biomarker: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn*, 18(2):133-145. doi:10.1080/14737159.2018.1425143
176. Panditharatna E, Kilburn LB, Aboian MS, et al. (2019). Clinically Relevant and Minimally Invasive Tumor Surveillance of Pediatric Diffuse Midline Gliomas Using Patient-Derived Liquid Biopsy. *Clin Cancer Res*, 24(23):5850-5859. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1345.
177. Hargrave DR, Bouffet E, Tabori U, et al. (2019). Efficacy and safety of dabrafenib in pediatric patients with BRAF V600 mutation-positive relapsed or refractory low-grade glioma: Results from a phase I/IIa study. *Clin Cancer Res*, 25(24):7303-7311. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-2177
178. Boire A, Brandsma D, Brastianos PK, et al. (2019). Liquid biopsy in central nervous system metastases: A RANO review and proposals for clinical applications. *Neuro Oncol*, 21(5):571-583. doi:10.1093/neuonc/noz012

179. Smalley KSM, Forsyth PA. (2018). The Blood Brain Barrier and BRAF inhibitors: Implications for patients with melanoma brain metastases. *Pharmacol Res*, 135:265-267. doi:10.1016/j.phrs.2017.11.013
180. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*, 2(1). doi:10.3402/jev.v2i0.20360
181. Chen M, Zhao H. (2019). Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics*, 13(1):34. doi:10.1186/s40246-019-0220-8