

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Ventajas de la secuenciación de próxima generación sobre la hibridación fluorescente *in situ* para detectar la codeleción 1p/19q en oligodendrogliomas

Advantages of next generation sequencing over fluorescent *in situ* hybridization to detect 1p/19q codeletion in oligodendroglioma / Vantagens do sequenciamento de próxima geração sobre a hibridação fluorescente *in situ* para detectar codelecção 1p/19q em oligodendrogliomas

León Darío Ortiz Gómez^{1,2,3}, David Andrés Galvis Pareja², Ronald Guillermo Peláez Sánchez¹, Carlos Jaime Yepes^{1,3}, Piedad Matilde Agudelo Flórez¹.

RESUMEN

El perfil molecular de los gliomas permite garantizar la precisión del diagnóstico, informar el pronóstico e identificar opciones de tratamiento. Esta revisión tiene como objetivo exponer que con la secuenciación de próxima generación (NSG) el diagnóstico de los pacientes con oligodendrogliomas puede ser más exacto. Además, con un dispositivo de diagnóstico *in vitro*, basado en la NSG (F1CDx), en el que se utilizan los bloques de parafina de gliomas para analizar hasta 395 genes relacionados con cáncer (incluido IDH 1 y 2), se puede también informar la pérdida de la totalidad del brazo corto del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 19 (codeleción 1p/19q), a diferencia de la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) que detecta desde la más mínima deleción, lo cual los hace sensibles pero no específicos ya que el FISH es incapaz de distinguir entre la pérdida de la totalidad del brazo del cromosoma y una deleción focal. Esta distinción es importante ya que la supervivencia es inferior en tumores con deleción parcial en relación con los oligodendrogliomas, que tienen por definición la pérdida total de ambos cromosomas. Se hace también alusión a otras plataformas genómicas como GlioSeq y GLIO-DNA panel, que pueden cumplir la misma función. En conclusión, la F1CDx puede determinar con precisión 1p/19q con una concordancia del 96.7% frente a FISH. Los casos en que el FISH dio positivo y no concordaban con F1CDx, era porque no se trataba de oligodendrogliomas. F1CDx también analiza todos los genes que permiten la aproximación más exacta al diagnóstico de oligodendroglioma.

Palabras clave: glioma; oligodendrogliomas del adulto; isocitrato deshidrogenasa

ABSTRACT

Molecular profiling of gliomas helps ensure diagnostic accuracy, inform prognosis, and identify treatment options. This review aims to show that with next generation sequencing (NGS) the diagnosis of patients with oligodendrogliomas can be more accurate. In addition, with an *in vitro* diagnostic device, based on NSG (F1CDx), in which glioma paraffin blocks are used to analyze up to 395 cancer-related genes (including IDH 1 and 2), it is also possible to report the loss of the entire short arm of chromosome 1 and the long arm of chromosome 19 (1p/19q codeletion), unlike fluorescence *in situ* hybridization (FISH) that detects even the slightest deletion, making them sensitive but not specific, as FISH is unable to distinguish between the loss of the entire arm of the chromosome and a focal deletion. This distinction is important since survival is lower in

Fecha de recibido:

21 de junio de 2022.

Fecha de aprobación:

3 de noviembre de 2022.

Forma de citar este

artículo: Ortiz LD, Galvis DA, Peláez RG, Yepes CJ, Agudelo PM. Ventajas de la secuenciación de próxima generación sobre la hibridación fluorescente *in situ* para detectar la codeleción 1p/19q en oligodendrogliomas. Med UPB. 2023;42(1):85-95. DOI:10.18566/medupb.v42n1.a11

- 1 Escuela de graduados, Grupo de Ciencias Básicas, Universidad CES. Medellín, Colombia
- 2 Grupo Farmacodinamia, Universidad CES. Medellín, Colombia
- 3 Instituto de Cancerología, Clínica Las AméricasAUNA. Medellín, Colombia.

Dirección de

correspondencia: León Darío Ortiz Gómez. Correo electrónico: lortiz@uces.edu.co

tumors with partial deletion compared to oligodendrogliomas, which by definition have the total loss of both chromosomes. Reference is also made to other genomic platforms such as Glioseq and GLIO-DNA panel, which can fulfill the same function. In conclusion, the F1CDx can accurately determine 1p/19q with a concordance of 96.7% against FISH. The cases in which the FISH was positive and did not agree with F1CDx, it was because they were not oligodendrogliomas. F1CDx also analyzes all the genes that allow the most accurate approach to the diagnosis of oligodendroglioma.

Keywords: glioma; adult oligodendrogliomas; isocitrate dehydrogenase

RESUMO

O perfil molecular de gliomas ajuda a garantir a precisão do diagnóstico, informar o prognóstico e identificar as opções de tratamento. Esta revisão tem como objetivo mostrar que com o sequenciamento de próxima geração (NSG) o diagnóstico de pacientes com oligodendrogliomas pode ser mais preciso. Além disso, com um dispositivo de diagnóstico *in vitro baseado em NSG* (F1CDx), no qual blocos de parafina de glioma são usados para analisar até 395 genes relacionados ao câncer (incluindo IDH 1 e 2), também é possível relatar a perda do todo o braço curto do cromossomo 1 e o braço longo do cromossomo 19 (codelecção 1p/19q), ao contrário da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) que detecta desde a menor deleção, o que os torna sensíveis, mas não específicos, pois o FISH é incapaz de distinguir entre a perda de todo o braço do cromossomo e uma deleção focal. Essa distinção é importante, pois a sobrevivência é menor nos tumores com deleção parcial em relação aos oligodendrogliomas, que por definição apresentam a perda total de ambos os cromossomos. Também é feita referência a outras plataformas genômicas, como Glioseq e painel GLIO-DNA, que podem cumprir a mesma função. Em conclusão, o F1CDx pode determinar com precisão 1p/19q com uma concordância de 96,7% versus FISH. Os casos em que FISH foi positivo e não concordaram com F1CDx, foi porque não eram oligodendrogliomas. O F1CDx também analisa todos os genes que permitem a abordagem mais precisa para o diagnóstico de oligodendroglioma.

Palavras-chave: glioma; oligodendrogliomas adultos; isocitrato desidrogenase

INTRODUCCIÓN

La clasificación molecular de las neoplasias del SNC basada en mutaciones somáticas, alteraciones epigenéticas y variantes del número de copias es importante para establecer el diagnóstico, el pronóstico y seleccionar el tratamiento en tumores histológicamente similares¹. El oligodendroglioma se caracteriza por tener mutado el gen de la IDH 1 o 2 y tener una variante del número de copias de pérdida concurrente de los brazos cromosómicos completos 1p y 19q². A diferencia de la codeleción 1p/19q en el oligodendroglioma, el astrocitoma y otros tumores a menudo tienen pérdidas menores de material genético (deleciones parciales de 1p y 19q)^{3,4}. Independientemente del tratamiento, la codeleción 1p/19q es un factor de pronóstico favorable. En los pacientes con glioma se observa una mejor respuesta a la radioterapia y la quimioterapia con agentes alquilantes como la temozolomida, el lomustine o la procarbazine en los que tienen la codeleción 1p/19q, en comparación con pacientes sin la codeleción 1p/19q típica^{5,6}. Por lo tanto, la codele-

cción 1p/19q se considera uno de los biomarcadores más sólidos en neurooncología, debido a que es diagnóstico, pronóstico y predictivo⁷.

Las técnicas clínicas de rutina utilizadas para detectar la codeleción 1p/19q incluyen la hibridación *in situ* fluorescente (FISH)⁸, el análisis de microsatélites⁹, la amplificación de sondas dependiente de los ligandos múltiples (MLPA)¹⁰, las matrices de polimorfismo de un solo nucleótido de alta densidad del genoma completo (SNP-A)¹¹ y la matriz de metilación¹². Sin embargo, con todas ellas, habría que hacer aparte el análisis de mutaciones.

FISH es una técnica usada para el análisis 1p/19q¹³, pero no distingue entre deleciones intersticiales pequeñas y de todo el brazo de los cromosomas⁴. La codeleción 1p/19q es específica para el diagnóstico de oligodendroglioma y está mediada por una translocación desequilibrada pericentromérica que provoca la pérdida completa de los brazos 1p y 19q¹⁴. FISH tampoco puede detectar la pérdida de heterocigosidad neutra del número de copias (CN-LOH). SNP-A tiene la capacidad única de delinear un defecto cromosómico previamente oculto,

la CN-LOH, pero no puede revelar mutaciones en los pares de bases. La matriz de metilación con una combinación de cambios de metilación de ADN adquiridos somáticamente y la célula de origen, pueden proporcionar información sobre el número de copias, incluido el estado de codeleción 1p/19q, pero no puede revelar mutaciones somáticas¹⁵.

Con base en una técnica de secuenciación de próxima generación (NSG), plataformas como FoundationONE CDx, GliSeq y GLIO-DNA panel se han utilizado para detectar mutaciones clínicamente significativas y que permiten dirigir la terapia en neoplasias malignas cerebrales. Proporcionan una secuenciación rentable de cientos de objetivos genéticos a partir de material de archivo incluido en parafina, fijado con formalina (FFPE) en el entorno clínico. Es una técnica sensible y eficiente para identificar al mismo tiempo mutaciones específicas, como la detección de variantes de un solo nucleótido (SNIP), que si están en regiones codificantes pueden causar sustituciones sinónimas, una sustitución con cambio de sentido, una sustitución sin sentido que provoca la aparición de un codón de parada o mutaciones de empalme (*splicing*). También detecta pequeñas mutaciones de inserción o delección (*indels*), fusiones y modificaciones en la metilación de promotores, entre otras, en un gran panel de genes asociados con tumores malignos¹⁶.

Las variantes en el número de copias, incluidas la codeleción 1p/19q, la secuenciación del exoma y los ensayos NSG dirigidos, se han explorado recientemente en tumores cerebrales con varias líneas de análisis¹⁷. El uso potencial de un ensayo NSG dirigido, para detectar la codeleción 1p/19q, junto con las mutaciones somáticas en varias neoplasias malignas cerebrales para el diagnóstico de oligodendroglioma es prometedor en un entorno clínico. Una ventaja de las pruebas de NSG para oligodendrogliomas, en particular, es su capacidad para evaluar mutaciones de muchos genes relevantes para el diagnóstico, que forman parte del perfil genético de este tumor^{18,19}.

TEMA CENTRAL

El promedio anual de tumores cerebrales diagnosticados en Estados Unidos (EE. UU.) entre 2014 y 2018 fue de 86 355 casos; de estos, 25 105 (29%) fueron clasificados como malignos (29%)²⁰ y 21 146 (24.4%) fueron gliomas. Los gliomas más frecuentes son los difusos del adulto, esto es, el oligodendroglioma mutado para IDH y con codeleción 1p/19q ($O^{mut-IDH,codec1p/19q}$), que va de grado I a III²¹ survival rates and treatment options have stagnated over the past few decades with few advancements. In this study, we utilize low grade glioma RNA-

seq data from the Cancer Genome Atlas (TCGA-LGG; el astrocitoma mutado para IDH y sin codeleción 1p/19q ($A^{mut-IDH,sin-codec1p/19q}$), que va del grado II a IV, y el Glioblastoma IDH silvestre ($GB^{silv-IDH}$)²². En este último, por ser más frecuente, se ha logrado establecer una guía de manejo estándar que consiste en una citorreducción quirúrgica lo más amplia posible²³, seguida de radioterapia concomitante con temozolomida y temozolomida adyuvante, con lo que se logra una mediana de supervivencia (OS) de 14.6 meses²⁴.

Los $O^{mut-IDH,codec1p/19q}$ son más sensibles a radioterapia y quimioterapia que los tumores de estirpe astrocitaria^{25,26}. Es por ello por lo que se duda de la importancia de una resección quirúrgica amplia²⁷. Luego de la cirugía se recomienda en los grados 2 radioterapia o temozolomida, con una OS de 16.5 años²⁰, y en los grado 3 el uso secuencial de radioterapia y temozolomida, pudiéndose iniciar con cualquiera de las dos²⁸, con una OS de ocho años²⁰. De allí la importancia de un correcto diagnóstico histológico²⁹.

La clasificación del 2016 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se basaba en hematoxilina-eosina (H-E), en inmunohistoquímica (IHQ) utilizada, entre otras, para la búsqueda de mutación de R132H de la IDH1 y FISH para el rastreo de la codeleción 1p/19q³⁰. A partir del 2021 se ha incorporado la búsqueda de mutaciones y alteraciones epigenéticas³¹, que permiten definir con mayor exactitud el tipo de glioma³². En el $O^{mut-IDH,codec1p/19q}$ se deben buscar la mutación del promotor de TERT, de CIC, de FUBP1 y de NOTCH1. En el $A^{mut-IDH,sin-codec1p/19q}$ son frecuentes la mutación de ATRX, de TP53 y de CDKN2A/B y en $GB^{silv-IDH}$ la mutación del promotor de TERT, de EGFR y la trisomía del cromosoma 7 y la monosomía del cromosoma 10³³.

La anterior información se puede obtener a través de FoundationONE CDx (F1CDx). F1CDx es un dispositivo de diagnóstico *in vitro* basado en la NSG, permite la detección de SNIP, alteraciones de inserción, indels y alteraciones en el número de copias (CNV) en 324 genes y reordenamientos de genes seleccionados, así como firmas genómicas que incluyen inestabilidad microsatelital y carga mutacional del tumor³⁴. Si bien las alteraciones cromosómicas por variaciones en el número o en la estructura normal de los cromosomas como la codeleción 1p/19q, la trisomía 7 y la monosomía 10, se pueden detectar con el cariotipo tradicional³⁵, cariotipo espectral³⁶, con hibridización *in situ* fluorescente multifluor³⁷, con FISH³⁸, con MLPA³⁹, con SNP-A⁴⁰ y la matriz de metilación¹⁵, la NSG tiene la ventaja de dar información simultánea de las mutaciones y CNV¹⁸.

En oligodendrogliomas se ha buscado clásicamente la codeleción 1p/19q por FISH. Se consiguen varias pruebas comerciales que detectan desde la más mínima

deleción⁴¹, que los hace sensibles pero no específicos, ya que el FISH es incapaz de distinguir entre la pérdida de la totalidad del brazo del cromosoma y una deleción focal. Esta distinción es importante porque la OS es inferior en aquellos tumores con deleción focal en relación con los $O_{mut-IDH,code1p/19q}$, que tienen por definición la pérdida total de ambos cromosomas¹⁴.

$O_{mut-IDH,code1p/19q}$ grados 2 y 3: según el registro Central de Tumores Cerebrales de EE. UU (CBTRUS) 2014-2018, la incidencia anual de glioblastoma fue de 12 340 casos, de astrocitoma anaplásico, 2981 y de tumores oligodendrogliales 1109, de los cuales 607 eran grado II y 355 grado III²⁰. Las características histológicas que se han relacionado con un mayor grado son alta celularidad, marcada atipia citológica, intensa actividad mitótica, proliferación microvascular patológica y necrosis con o sin empalizada. Los oligodendrogliomas de grado III de la OMS del SNC suelen mostrar varias de estas características; sin embargo, el impacto individual de cada característica no está claro, en particular porque la mayoría de los estudios de pronóstico no se han limitado previamente a los tumores con mutación IDH y con codeleción 1p/19q. La proliferación microvascular y la actividad mitótica enérgica, definida como ≥ 2.5 mitosis/mm² (que equivalen a ≥ 6 mitosis/10 HPF de 0,55 mm de diámetro y 0.24 mm² de área) se informaron como indicadores de corta supervivencia en un estudio de oligodendrogliomas definidos histológicamente⁴².

Otros estudios de oligodendrogliomas grado III de la OMS con codeleción 1p/19q, sugirieron que la proliferación microvascular con necrosis están relacionadas con una supervivencia más corta que la actividad mitótica elevada de ≥ 2.5 mitosis/mm², sin proliferación microvascular ni necrosis⁴³. Pero, no se dispone de datos que definan un punto de corte claro para un recuento mitótico que distinga el grado II de la OMS del SNC del grado III de la OMS del SNC de oligodendrogliomas con mutación IDH y 1p/19q codelecionados. La deleción homocigótica que involucra el locus CDKN2A o CDKN2B, se encuentra en un pequeño subconjunto (<10%) de oligodendrogliomas de grado III de la OMS del SNC, pero no en oligodendrogliomas de grado II de la OMS del SNC, y se ha relacionado con una supervivencia reducida, independientemente de la proliferación microvascular con o sin necrosis⁴⁴.

En la codeleción 1p/19q se pierde el brazo corto del cromosoma 1 y el brazo largo del cromosoma 19⁴⁵. Independiente de los hallazgos histológicos, la presencia de codeleción 1p/19q, asociada a mutación del gen *IDH1/2*, hace el diagnóstico de oligodendroglioma aun en tumores con características histológicas ambiguas o mixtas⁴⁶⁻⁴⁸. A los gliomas con mutación de la *IDH 1/2*

que no muestren pérdida de expresión del gen del síndrome de déficit intelectual/alfa-talasemia relacionado al X (*ATRX*), del gen de la proteína tumoral p53 (*TP53*) y del gen del inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (*CDKN2A/B*), se les debe solicitar algún test para evaluar la codeleción 1p/19q, incluso en aquellos que no se observe una clara histología de oligodendroglioma^{49,50}.

NSG: una vez que tenga una muestra de la lesión neoplásica, que puede ser una biopsia líquida o tejido tumoral fresco o embebido en parafina, se puede utilizar para efectuar la secuenciación. Se recomienda secuenciar todo el genoma, los exones o ciertos genes de interés, en este caso los que se han relacionado con cáncer. Se hace secuenciación del genoma completo cuando se realizan protocolos de investigación⁵¹; por ejemplo, para detectar nuevos genes implicados en el desarrollo de cáncer. Pero, en la evaluación de un paciente esto sería muy costoso y la cantidad de información que se obtendría sería difícil de interpretar y aplicar en caso de neoplasia maligna específica, en el que usualmente se buscan biomarcadores pronósticos y predictores de respuesta. Se debe tener en cuenta que se puede hacer secuenciación para detectar alteraciones en el DNA, el RNA⁵² o a nivel epigenético⁵³.

Para la secuenciación del DNA, luego de seleccionar el tejido tumoral y que esté libre de parafina, se debe extraer el DNA y ello se hace rompiendo los millones de células de la muestra y purificando el DNA obtenido. Con este DNA purificado, se pueden hacer pruebas como en Southern Blotting para analizar uno o varios genes, pero la NSG ha hecho posible observar en paralelo muchos genes al mismo tiempo, inclusive, hacer el análisis de las muestras de varios pacientes de forma simultánea⁵⁴.

El paso siguiente es la fragmentación donde las largas hebras de DNA cromosómico se descomponen en fragmentos cortos. Estos fragmentos de DNA crean lo que se denomina librería de secuenciación. Es de anotar que estos fragmentos tendrán doble cadena por lo que se separan a cadena sencilla con calor, a esto se le llama desnaturalización. A cada uno de estos fragmentos se le unen unas secuencias adaptadoras denominadas *primers*, también conocidas como cebos o sondas, que son una especie de código de barras cuya secuencia ya se conoce y se ha seleccionado dependiendo del conjunto de genes que se quieran revisar; en este caso, ciertos genes que están involucrados en la génesis y posterior evolución de los oligodendrogliomas. A su vez, estos adaptadores van a buscar su secuencia complementaria en un panel, que a su vez tiene un imán que atrae los adaptadores. Luego de la primera calza en el panel, teniendo unido un fragmento de DNA, se hace PCR de cada fragmento de cadena simple, lo que va conformando una serie de clúster, cada uno de ellos con un puntaje de calidad, que

permite descartar los que tienen puntajes bajos. Haciendo un lavado se puede separar el primer de los fragmentos secuenciados en paralelo y así se forma una biblioteca de secuenciación⁵⁵.

Al tener la biblioteca de secuenciación se procede a hacer la alineación. Como base se tiene una secuenciación conocida, que podría ser todo el genoma o un panel de genes seleccionado de acuerdo con la patología a analizar, en este caso cáncer. Esta secuencia conocida puede ser una de referencia, que es una versión específica del genoma humano representativa de individuos sanos, pero ya se están incluyendo variantes poblacionales. A medida que se van alineando computacionalmente con base en la secuencia seleccionada (matriz), los fragmentos secuenciados por PCR en paralelo y de los que desconocemos la secuencia, se va conformando una estructura en la que podrán observar las variantes⁵⁶.

Una métrica importante cuando se buscan resultados de secuenciación es la cobertura media, que es el número promedio de lecturas que cubren cada ubicación dentro de su región de interés. La cobertura media deberá ser mayor cuando se está secuenciando todo el genoma, lo que aumenta costo y complejidad en la interpretación. Esta métrica es importante porque cuanto mayor sea su cobertura, con más confianza podrá realizar la detección de variantes⁵⁷.

Esta detección no solo implica buscar determinada alteración, sino saber su ubicación. Se puede detectar la variación de SNIP, en donde se observa cómo hay un nucleótido que no va en consonancia con el que se debería esperar al de base, por ejemplo si en la plantilla hay una G (guanina), toda la fila debería tener C (citocina) en donde es importante analizar la frecuencia de variante del alelo (VAF), la cual es la fracción del total de lecturas que contienen la variante; en este caso, cuatro de las diez lecturas tienen la variante G, entonces, la frecuencia alélica variante sería 0.4 o 40 por ciento. La VAF es importante porque puede proporcionar pistas sobre el origen y la naturaleza de la variante acerca de si la mutación es heredada o somática, si es homocigota o heterocigota. También variará según el grado de pureza del tejido tumoral, esto es concentración de tumor en relación con el tejido vecino sano y su heterogeneidad. Todo este análisis pueda proporcionar pistas sobre el origen y la naturaleza de la variante que se está revisando. Hay unas variaciones menos frecuentes, que se pueden observar en las células cancerosas, como inserciones o *indels*, que implican la adición o eliminación de pequeñas cantidades de nucleótidos, y estas pueden identificarse mediante métodos similares⁵⁸.

Con relación a CNV, consisten en encontrar en el alineamiento de la biblioteca de secuenciación un exceso (inserciones) o defectos (deleciones) de nucleótidos⁵⁹the

histogram-based outlier score (HBOS). En los reordenamientos o rearrreglos están incluidas translocaciones e inversiones entre otras, que llevan a que se fusione la totalidad o parte de dos genes. Para detectar este tipo de alteración, es importante buscar en la secuenciación de referencia desde inicio y final de cada parte del gen que se va a fusionar⁶⁰.

En un ejemplo de informe final, se anota el diagnóstico y la pureza del espécimen, el número de lecturas, alrededor de la coordenada X. Las lecturas por encima de la coordenada representan ganancia, y por debajo, pérdida⁶¹.

Una forma de distinguir entre mutaciones de línea germinal y línea somática es comparar una muestra de tumor con una muestra tomada de tejido normal, porque las variantes de línea germinal se encontrarán en ambos lugares, mientras que las mutaciones somáticas se hallarán exclusivamente en la muestra de tumor. Sin embargo, no siempre es práctico o rentable ni ético analizar una muestra de tejido normal distante además de una muestra de tumor. En cambio, esta información a veces se puede extrapolar solo de una muestra de tumor, utilizando la frecuencia de alelos variante (VAF). El VAF es la fracción de lecturas que cubren una región genómica particular que contiene una variante, y puede proporcionar información sobre el origen de esta, si es de línea germinal o somática, y homocigótica o heterocigótica. Esto se debe a que la mayoría de las muestras de tumores son una mezcla heterogénea de células cancerosas y tejido normal vecino⁶².

Una variante de línea germinal heredada estará en todas las células del cuerpo, tanto normales como cancerosas. Se encontrará una variante de línea germinal homocigótica en las copias del genoma heredadas de la madre y del padre, mientras que una variante heterocigota se encontrará en una sola copia. Esto significa que se debe observar una variante de línea germinal homocigótica en todas las lecturas de secuenciación de la muestra, mientras que se debe observar una variante de línea germinal heterocigótica en aproximadamente el 50% de las lecturas⁶².

Por el contrario, una mutación somática estaría en las células tumorales y no en las células normales, por lo que, en este caso, la VAF dependerá de la pureza y heterogeneidad de la muestra tumoral. La pureza del tumor es una estimación del porcentaje de células en la muestra de secuenciación que eran células cancerosas; el resto de la muestra está formado por células normales del tejido circundante y otras células del microambiente del tumor, como las inmunitarias. Al analizar un ejemplo de una mutación somática clonal que está presente en todas las células cancerosas y en ninguna de las células normales de la muestra, y que no se encuentra en una región amplificada del genoma, si es una variante homo-

cigótica la VAF sería aproximadamente igual a la pureza del tumor, ya que la fracción de lecturas que contiene la variante se mostraría equivalente a la fracción de células con la mutación. Entonces, si la pureza tumoral de la muestra fuera del 25%, la VAF estaría igual a 0.25% o 25%. Si es heterocigoto, la VAF podría ser de la mitad de la pureza del tumor, ya que sería la mitad de las lecturas que se originan en las células cancerosas; en este caso, 0.125 o 12.5%⁶².

En muchos casos, comprender las implicaciones de la VAF puede ser más complejo. Por ejemplo, una mutación presente en una fracción de las células cancerosas puede tener un rango de valores de VAF. Además, los cambios en el número de copias pueden afectar el VAF⁶³.

Por ejemplo, si algunas de las células cancerosas tienen una amplificación de la región que contiene una mutación, eso aumentará la VAF de esa mutación. En otros casos, una muestra de tumor puede ser 100% pura, lo que dificultaría la distinción entre la línea germinal y las mutaciones somáticas. En estos, sería difícil extrapolar la información sobre el origen de la variante de la VAF. También es importante recordar que puede haber otras mutaciones importantes que no se ven en absoluto porque no están presentes en la parte del tumor de la que se tomaron muestras durante la secuenciación. Empero, en ocasiones, se puede utilizar la VAF de una mutación identificada durante la secuenciación del tumor para extrapolar información sobre su origen. Si la VAF es mucho mayor que la pureza del tumor es probable que sea una variante de la línea germinal. Por otro lado, una VAF muy baja podría sugerir que solo está presente en una pequeña fracción de las células cancerosas. En general, esta información puede ayudar a dilucidar el papel que desempeña una variante en el desarrollo del cáncer⁶³.

Una vez que se tiene la lista de todas las mutaciones o variantes presentes en la muestra del tumor seleccionada del bloque de parafina o la biopsia líquida, lo siguiente que se debe hacer es determinar cuáles son biológicamente importantes ya que por el solo hecho de que las mutaciones estén presentes no significa que todas sean relevantes para la biología del cáncer (conductoras o *drivers*) ya que algunas de estas pueden ser pasajeras. Se tiene entonces una lista de mutaciones que están presentes en las células cancerosas con base en el análisis de secuenciación y esta puede ir desde una sola mutación en algunos cánceres infantiles como BRAF V600 en gliomas de bajo grado, hasta cientos de mutaciones en tumores malignos genéticamente complejos como el glioblastoma. A partir de ahí se debe interpretar la variación para determinar cuál de esas mutaciones podría ser importante en función de la información conocida sobre cada mutación. Dichas mutaciones pueden clasificarse como patógenas, benignas o puede tener un significado incierto o desconocido. Es

importante afirmar que, desde el principio, la categorización de una mutación no es estática, puede cambiar con el tiempo a medida que se acumula más información sobre esa mutación en particular⁶⁴.

Con relación a las variantes patógenas, son variantes que se han observado en células cancerosas muchas veces antes y se sabe que impulsan el cáncer (*drivers*) y para dar un ejemplo hay una variante patógena en el gen *IDH1* que se conoce como una mutación impulsora importante en un subconjunto de personas con $O^{mut-IDH1,code1p/19q}$ y $A^{mut-IDH1,sin-code1p/19q}$ y se caracteriza como *IDH1* c395 G>A R132H y cuya lectura comienza con la denominación del gen (*IDH1*). La c. señala que la variante está en la región codificante del gen o en la región que traduce la proteína y el siguiente número le da la posición del nucleótido (395). La G>A muestra el cambio en esta posición de una guanina (T) a una A adenina (A). En ocasiones, además de eso, se agrega una segunda anotación que indica el efecto de la variante en la proteína, en este caso (R132H) que relaciona la posición del aminoácido afectado y las dos letras a cada lado y este caso la R de arginina y la H de histidina, exhibe que en dicha posición de la proteína se cambió la arginina por histidina, lo que da origen a una mutación sin sentido en la que un aminoácido se sustituye por otro, y trunca de allí en adelante la transducción de la proteína⁶⁵.

Para resumir, la nomenclatura describe el cambio en el DNA y la secuencia de proteínas que causa la variante, en este caso de nucleótido simple, denominado SNIP o polimorfismo de nucleótido único.

FISH vs. F1CDx: un algoritmo es un conjunto de instrucciones o reglas definidas y no ambiguas, ordenadas y finitas, que permite, típicamente, solucionar un problema, realizar un cómputo, procesar datos y llevar a cabo otras tareas o actividades⁶⁶. Con algoritmos basados en SNG⁶⁷ se pueden reconstruir vías moleculares que llevan a identificar biomarcadores de expresión de grado tumoral y supervivencia⁶⁸. Con F1CDx es posible utilizar un algoritmo para evaluar la delección de los brazos completos 1p y 19q a partir de los datos de secuenciación, y para ello se utilizaron 463 muestras de glioma. Este algoritmo de modelado del número de copias utiliza los datos de cobertura de las regiones cebadas del genoma dentro de cada muestra, normalizados a un control emparejado con el proceso, para modelar el número de copias de cada segmento. Las frecuencias de alelos menores de hasta 59 622 SNP distribuidos en cada segmento se utilizaron para determinar la pérdida de heterocigocidad (LOH). Entonces el algoritmo calculó el porcentaje de los brazos 1p/19q que fueron monoalélicas (baja LOH)⁶⁹. De las 436 muestras, se conocía el estado de *IDH1/2* en 60.7% (281/463) con resultados de FISH disponibles. Se encon-

tró HDH1 R132H en el 84% (236/281) y IDH2 R172 en el 6% (18/281). Se encontró alteración patogénica de *TP53* en 46% (212/463), en *ATRX* en 26% (120/462) y en *pTERT* en 53% (345/463)¹⁸.

Para la predicción de la pérdida total de brazos en 1p/19q, se determinó el número de copias y el estado LOH. Una muestra se consideró candidata para codificar computacionalmente si más del 50% de los brazos 1p y 19q eran monoalélicos, es decir, tenía pérdida de heterocigocidad 1p y 19q. Se compararon los resultados del algoritmo de NSG para la codeleción de brazo completo con los FISH y se evaluó la concordancia. Para las 436 muestras, independientemente de su estado IDH, se observó una concordancia del 96,7% (449/463, IC95% 95.0-98.3), un VPP de 100% (142/142, IC95% 97.4-100) y una PPP de 91% (142/156, IC95% 85.4-95). Las muestras positivas para la codeleción 1p/19q del brazo completo tenían una pureza tumoral mediana del 50% (rango 20-90%), mientras que las muestras negativas para la codeleción 1p/19q del brazo completo tenían una pureza tumoral del 40% (rango 20-90%). También se analizó el estado de codeleción 1p/19q de brazo completo en las muestras de los 281 gliomas mutados de IDH1/2, comparadas con los resultados de FISH observándose una concordancia del 97% (273/281), un VPP del 100% (139/139) y un PPP del 94.6% (139/147)¹⁸.

Al analizar la discordancia, que ocurrió en 14 muestras, que FISH calificó como positivas y negativas por el algoritmo basado en NSG, no se vio evidencia que indicara que la pureza del tumor afectará la concordancia. Seis muestras discordantes fueron todas negativas para mutaciones que involucran IDH1/2, CIC, FUBP1, lo que no sería característico de tumores de linaje oligodendroglial que albergan una verdadera codeleción 1p/19q de brazo completo. Ocho muestras discordantes tenían la mutación IDH1. La revisión manual de los datos del número de copias de estas muestras reveló que seis casos albergaban la pérdida parcial o total de un brazo y estas muestras albergaban alteraciones concurrentes que involucraban a *TP53* y *ATRX*, características de los $A^{mut-IDH, sin-codeleción 1p/19q}$. Estos hallazgos sugieren que las 14 muestras discordantes informadas como 1p/19q por FISH, no son de verdaderos $O^{mut-IDH, codeleción 1p/19q}$ realmente¹⁸.

GlioSeq: test de NGS dirigido basado en amplificación que analiza 30 genes para variantes de un solo nucleótido (SNV) e *indels*, 24 genes para variaciones en el número de copias (CNV) y 14 tipos de alteraciones estructurales en los genes *BRAF*, *EGFR* y *FGFR3* en un solo flujo de trabajo⁷⁰. Una ventaja de las pruebas de NGS para oligodendrogliomas, en particular, es su capacidad

para evaluar simultáneamente mutaciones en muchos genes relevantes para el diagnóstico, que forman parte del perfil genético de este tumor, incluidos IDH1/IDH2, promotor de *TERT*, *ATRX*, *TP53*, *CIC* y *FUBP1*.

Pallavajjala *et al.*, investigaron la viabilidad de utilizar NGS para detectar simultáneamente la codeleción 1p/19q y las mutaciones somáticas. En 247 pacientes consecutivos con tumores cerebrales fijados en formalina e incluidos en parafina con varios subtipos, la NGS reveló la codeleción 1p/19q en 26 oligodendrogliomas y un astrocitoma de tipo salvaje IDH. Se encontró también pérdida parcial en los cromosomas 1p y 19q; pérdida de todo el brazo en solo uno de los dos cromosomas, y CN-LOH en 11 tumores no oligodendrogliales⁷¹.

GLIO-DNA panel: permite la caracterización molecular de los gliomas a través de la detección simultánea de las principales mutaciones y alteraciones en el número de copias⁶⁸. Se enfoca en variaciones genéticas y cromosómicas específicas que involucran el gen de la IDH1, el remodelador de cromatina *ATRX*, *CDKN2A*, *pTERT* y reconoce la codeleción 1p/19q⁷², la ganancia del cromosoma 7 y la pérdida del cromosoma 10. Además evalúa el nivel de metilación del promotor del gen O^6 metilguanina-DNA metiltransferasa (*MGMT*), predictor de la eficacia de la temozolomida⁷³ y otras mutaciones como H3.3 histona A (*H3.3A*) para gliomas difusos de la línea media⁷⁴.

Un grupo italiano, liderado por Elena Tirrò, analizó esta técnica en 60 muestras de pacientes con glioma, para detectar la codeleción 1p/19q. Se utilizó el análisis de pérdida de la heterocigocidad (LOH) basado en SNP mediante NSG⁷⁵. Se incluyeron 45 SNP altamente pleomórficos ubicados en el brazo corto del cromosoma 1 (1p) y en el brazo largo del cromosoma 19 (19q) y se evaluó el desequilibrio alelo en la cohorte de pacientes. En cinco casos que se tenían de oligodendroglioma, el análisis NSG proporcionó los mismos resultados 1p/19q obtenidos por FISH, además estos casos albergaban una mutación IDH que apoyaba el diagnóstico histopatológico de oligodendroglioma. Sorprendentemente, NSG también permitió la identificación de un caso raro de glioblastoma que mostraba la pérdida conjunta de 1p/19q. Por último, LOH basado en SNP por NSG identificó ocho casos de glioblastoma con un desequilibrio alélico que involucraba solo al cromosoma 19q, mientras que ningún caso mostraba una pérdida alélica del cromosoma 1p¹⁹.

CONCLUSIONES

La clasificación molecular de las neoplasias cerebrales es importante para el diagnóstico, pronóstico y resultado

del tratamiento de tumores histológicamente similares.

El oligodendroglioma es un subtipo de glioma difuso infiltrante caracterizado por la codeleción 1p/19q y mutaciones IDH1o IDH2, que predicen un buen pronóstico, respuesta a la terapia y una mejor supervivencia general en comparación con los astrocitomas.

En un entorno clínico de rutina, la codeleción 1p/19q se detecta mediante FISH, y quizá otras técnicas más laboriosas, y las mutaciones somáticas se descubren mediante NSG. Pero la NSG permite descubrir simultáneamente la codeleción 1p/19q y las mutaciones somáticas,

así como la pérdida total de los brazos, a diferencia del FISH que encuentra pérdidas parciales y no las diferencia.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Esta revisión se deriva de la tesis doctoral del investigador León Darío Ortiz Gómez, titulada: Perfilamiento genómico exhaustivo y su utilidad como factor pronóstico de respuesta en pacientes con gliomas de alto grado a la segunda recaída.

REFERENCIAS

1. Pérez A, Huse JT. The evolving classification of diffuse gliomas: World Health Organization Updates for 2021. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2021;21(12):67.
2. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Cree IA, et al. cIMPACT-NOW update 6: New entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2020;30(4):844–56.
3. Ball MK, Kollmeyer TM, Praska CE, McKenna ML, Giannini C, Raghunathan A, et al. Frequency of false-positive FISH 1p/19q codeletion in adult diffuse astrocytic gliomas. *Neuro-Oncol Adv.* 2020;2(1):vdaa109.
4. De Biase D, Acquaviva G, Visani M, Marucci G, De Leo A, Maloberti T, et al. Next-generation sequencing panel for 1p/19q codeletion and IDH1-IDH2 mutational analysis uncovers mistaken overdiagnoses of 1p/19q codeletion by FISH. *J Mol Diagn.* 2021;23(9):1185–94.
5. Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: Long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol.* 2013;31(3):337–43.
6. Van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, Kros JM, Kouwenhoven MCM, Delattre JY, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: Long-term follow-up of EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol.* 2013;31(3):344–50.
7. Jamshidi P, Brat DJ. The 2021 WHO classification of central nervous system tumors: what neurologists need to know. *Curr Opin Neurol.* 2022 (in press).
8. Massaad E, Tabbarah A, Barmada M, Rbeiz J, Nasser S, Farra C. FISH analyses for 1p and 19q status on gliomas: Reporting an 8 years' experience from a tertiary care center in the Middle East. *Ann Diagn Pathol.* 2022;57:151899.
9. Nigro JM, Takahashi MA, Ginzinger DG, Law M, Passe S, Jenkins RB, et al. Detection of 1p and 19q loss in oligodendroglioma by quantitative microsatellite analysis, a real-time quantitative polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol.* 2001;158(4):1253–62.
10. Natté R, Eijk R, Eilers P, Cleton-Jansen AM, Oosting J, Kouwenhove M, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for the detection of 1p and 19q chromosomal loss in oligodendroglial tumors. *Brain Pathol.* 2006;15(3):192–7.
11. Harada S, Henderson LB, Eshleman JR, Gocke CD, Burger P, Griffin CA, et al. Genomic changes in gliomas detected using single nucleotide polymorphism array in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn.* 2011;13(5):541–8.
12. Woehrer A, Hainfellner JA. Molecular diagnostics: Techniques and recommendations for 1p/19q assessment. *CNS Oncol.* 2015;4(5):295–306.
13. Burger PC, Minn AY, Smith JS, Borell TJ, Jedlicka AE, Huntley BK, et al. Losses of chromosomal arms 1p and 19q in the diagnosis of oligodendroglioma. A study of paraffin-embedded sections. *Mod Pathol.* 2001;14(9):842–53.
14. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* 2006;66(20):9852–61.
15. Fernández AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, et al. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res.* 2012;22(2):407–19.
16. Reifenberger G, Wirsching HG, Knobbe-Thomsen CB, Weller M. Advances in the molecular genetics of gliomas —implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(7):434–52.

17. Zacher A, Kaulich K, Stepanow S, Wolter M, Köhrer K, Felsberg J, et al. Molecular diagnostics of gliomas using next generation sequencing of a glioma-tailored gene panel: Next generation molecular diagnostics of gliomas. *Brain Pathol.* 2017;27(2):146–59.
18. Sharaf R, Pavlick DC, Frampton GM, Cooper M, Jenkins J, Danziger N, et al. FoundationOne CDx testing accurately determines whole arm 1p19q codeletion status in gliomas. *Neuro-Oncol Adv.* 2021;3(1):vdab017.
19. Tirrò E, Massimino M, Broggi G, Romano C, Minasi S, Gianni F, et al. A Custom DNA-based NGS panel for the molecular characterization of patients with diffuse gliomas: Diagnostic and therapeutic applications. *Front Oncol.* 2022;12:861078.
20. Low JT, Ostrom QT, Cioffi G, Neff C, Waite KA, Kruchko C, et al. Primary brain and other central nervous system tumors in the United States (2014-2018): A summary of the CBTRUS statistical report for clinicians. *Neuro-Oncol Pract.* 2022;9(3):165–82.
21. Wong D, Lee TH, Lum A, Tao VL, Yip S. Integrated proteomic analysis of low-grade gliomas reveals contributions of 1p-19q co-deletion to oligodendroglioma. *Acta Neuropathol Commun.* 2022;10(1):70.
22. Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncol.* 2020;23(8):1231–51.
23. Wykes V, Zisakis A, Irimia M, Ughratdar I, Sawlani V, Watts C. Importance and evidence of extent of resection in glioblastoma. *J Neurol Surg Part Cent Eur Neurosurg.* 2021;82(01):075–86.
24. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987–96.
25. Van Den Bent MJ, Bromberg JEC, Buckner J. Low-grade and anaplastic oligodendroglioma. In: *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2022 Oct 15]. p. 361–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029978000220>
26. Otani R, Mukasa A, Uzuka T, Higuchi F, Matsuda H, Nomura M, et al. Gene expression profiling of 19q-loss astrocytomas suggest a specific pattern associated with the better prognosis. *J Neurooncol.* 2021;154(2):221–8.
27. Garton ALA, Kinslow CJ, Rae AI, Mehta A, Pannullo SC, Magge RS, et al. Extent of resection, molecular signature, and survival in 1p19q-codeleted gliomas. *J Neurosurg.* 2021;134(5):1357–67.
28. Ryckman JM, Surkar SM, Haque W, Butler EB, Teh BS, Verma V. Sequencing of chemotherapy and radiotherapy for newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *Am J Clin Oncol.* 2019;42(3):258–64.
29. Berger TR, Wen PY, Lang-Orsini M, Chukwueke UN. World Health Organization 2021 Classification of Central Nervous System Tumors and Implications for Therapy for Adult-Type Gliomas: A review. *JAMA Oncol.* 2022;8(10):1493–501.
30. Luchi T, Sugiyama T, Ohira M, Kageyama H, Yokoi S, Sakaida T, et al. Clinical significance of the 2016 WHO classification in Japanese patients with gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2018;35(2):71–80.
31. Brandner S. Molecular diagnostics of adult gliomas in neuropathological practice. *Acta Medica Acad.* 2021;50(1):29.
32. Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer.* 2022;128(1):47–58.
33. Komori T. Grading of adult diffuse gliomas according to the 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. *Lab Invest.* 2022;102(2):126–33.
34. Takeda M, Takahama T, Sakai K, Shimizu S, Watanabe S, Kawakami H, et al. Clinical application of the FoundationOne CDx Assay to Therapeutic decision-making for patients with advanced solid tumors. *The Oncologist.* 2021;26(4):e588–96.
35. Li Y, Sun T, Chen Z, Shao Y, Huang Y, Zhou Y. Characterization of a new human astrocytoma cell line SHG140: Cell proliferation, cell phenotype, karyotype, STR markers and tumorigenicity analysis. *J Cancer.* 2021;12(2):371–8.
36. Schröck E, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Spurbeck J, Jalal S, et al. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet.* 1997;101(3):255–62.
37. Junker K, Fritsch T, Hartmann A, Schulze W, Schubert J. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization (M-FISH) on cells from urine for the detection of bladder cancer. *Cytogenet Genome Res.* 2006;114(3–4):279–83.
38. Brown J, Byatt S, Khan T, St Heaps L, Dexter M, Nahar N, et al. FISH analysis of brain smears obtained at intraoperative diagnosis –An accurate and fast method to detect 1p/19q-codeletion in gliomas. *J Clin Neurosci.* 2021;92:115–9.
39. Jha P, Sarkar C, Pathak P, Sharma MC, Kale SS, Gupta D, et al. Detection of allelic status of 1p and 19q by microsatellite-based PCR versus FISH: Limitations and advantages in application to patient management. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B.* 2011;20(1):40–7.
40. Idbaih A, Ducray F, Dehais C, Courdy C, Carpentier C, de Bernard S, et al. SNP array analysis reveals novel genomic abnormalities including copy neutral loss of heterozygosity in anaplastic oligodendrogliomas. *Plos One.* 2012;7(10):e45950.

41. Pinkham MB, Telford N, Whitfield GA, Colaco RJ, O'Neill F, McBain CA. FISHing Tips: What every clinician should know about 1p19q analysis in gliomas using fluorescence *in situ* hybridisation. *Clin Oncol*. 2015;27(8):445–53.
42. Giannini C, Scheithauer BW, Weaver AL, Burger PC, Kros JM, Mork S, et al. Oligodendrogliomas: Reproducibility and prognostic value of histologic diagnosis and grading. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60(3):248–62.
43. Figarella-Branger D, Mokhtari K, Dehais C, Jouvet A, Uro-Coste E, Colin C, et al. Mitotic index, microvascular proliferation, and necrosis define 3 groups of 1p/19q codeleted anaplastic oligodendrogliomas associated with different genomic alterations. *Neuro-Oncol*. 2014;16(9):1244–54.
44. Appay R, Dehais C, Maurage CA, Alentorn A, Carpentier C, Colin C, et al. CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas. *Neuro-Oncol*. 2019;no:124.
45. Laghari AA, Khalid MU, Qadeer N, Shamim MS. Prognostic value of 1p/19q chromosomal codeletion in patients with oligodendroglioma. *JPMA J Pak Med Assoc*. 2019;69(1):132–4.
46. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncol*. 2021;23(8):1231–51.
47. van den Bent MJ, Smits M, Kros JM, Chang SM. Diffuse infiltrating oligodendroglioma and astrocytoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(21):2394–401.
48. Weller M, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M, et al. Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro-Oncol*. 2012;14(suppl 4):iv100–8.
49. Burger PC, Minn AY, Smith JS, Borell TJ, Jedlicka AE, Huntley BK, et al. Losses of chromosomal arms 1p and 19q in the diagnosis of oligodendroglioma. A study of paraffin-embedded sections. *Mod Pathol*. 2001;14(9):842–53.
50. Reuss DE, Sahn F, Schrimpf D, Wiestler B, Capper D, Koelsche C, et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an “integrated” diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2015;129(1):133–46.
51. Dao LTM, Galindo-Albarrán AO, Castro-Mondragon JA, Andrieu-Soler C, Medina-Rivera A, Souaid C, et al. Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions. *Nat Genet*. 2017;49(7):1073–81.
52. Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, Reinius B, Guillaumet-Adkins A, Smets M, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods. *Mol Cell*. 2017;65(4):631–643.e4.
53. Armand EJ, Li J, Xie F, Luo C, Mukamel EA. Single-cell sequencing of brain cell transcriptomes and epigenomes. *Neuron*. 2021;109(1):11–26.
54. Favello A, Hillier L, Wilson RK. Chapter 23. Genomic DNA Sequencing Methods. In: *Methods in Cell Biology* [Internet]. Elsevier; 1995 [cited 2022 Oct 17]. p. 551–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X0861403X>
55. Meyer M, Kircher M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010;2010(6):pdb.prot5448.
56. Koboldt DC. Best practices for variant calling in clinical sequencing. *Genome Med*. 2020;12(1):91.
57. Xu C, Zhang R, Shen H, Deng HW. Medium-coverage DNA sequencing in the design of the genetic association study. *Eur J Hum Genet*. 2020;28(10):1459–66.
58. McKinzie PB, Bishop ME. A Streamlined and high-throughput error-corrected next-generation sequencing method for low variant allele frequency quantitation. *Toxicol Sci*. 2019;kfz221.
59. Guo Y, Wang S, Yuan X. HBOS-CNV: A new approach to detect copy number variations from next-generation sequencing data. *Front Genet*. 2021;12:642473.
60. Vicedomini R, Vezzi F, Scalabrin S, Arvestad L, Policriti A. GAM-NGS: genomic assemblies merger for next generation sequencing. *BMC Bioinformatics*. 2013;14(S7):S6.
61. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, D'Amico P, Viale G, Trapani D, et al. Complexity of genome sequencing and reporting: Next generation sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real life. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;133:171–82.
62. Le Gallo M, Lozy F, Bell DW. Next-generation sequencing. In: Hedrick Ellenson L, editor. *Molecular genetics of endometrial carcinoma*. Springer International Publishing; 2017. p. 119–48.
63. Wardell CP, Ashby C, Bauer MA. FiNGS: High quality somatic mutations using filters for next generation sequencing. *BMC Bioinformatics*. 2021;22(1):77.
64. Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R, Vogel KJ, Weissman SM, Yackowski L, et al. Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10 000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med*. 2016;18(8):823–32.
65. Takano S, Tian W, Matsuda M, Yamamoto T, Ishikawa E, Kaneko MK, et al. Detection of IDH1 mutation in human gliomas: comparison of immunohistochemistry and sequencing. *Brain Tumor Pathol*. 2011;28(2):115–23.
66. Cormen TH. *Introduction to algorithms*. 3rd ed. Cambridge, Mass: MIT Press; 2009. 1292 p.
67. Abel HJ, Duncavage EJ. Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches. *Cancer Genet*. 2013;206(12):432–40.

68. Zolotovskaia MA, Kovalenko MA, Tkachev VS, Simonov AM, Sorokin MI, Kim E, et al. Next-generation grade and survival expression biomarkers of human gliomas based on algorithmically reconstructed molecular pathways. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7330.
69. Sun JX, He Y, Sanford E, Montesion M, Frampton GM, Vignot S, et al. A computational approach to distinguish somatic vs. germline origin of genomic alterations from deep sequencing of cancer specimens without a matched normal. *Plos Comput Biol.* 2018;14(2):e1005965.
70. Nikiforova MN, Wald AI, Melan MA, Roy S, Zhong S, Hamilton RL, et al. Targeted next-generation sequencing panel (GlioSeq) provides comprehensive genetic profiling of central nervous system tumors. *Neuro-Oncol.* 2016;18(3):379–87.
71. Pallavajjala A, Haley L, Stinnett V, Adams E, Pallavajjala R, Huang J, et al. Utility of targeted next-generation sequencing assay to detect 1p/19q co-deletion in formalin-fixed paraffin-embedded glioma specimens. *Hum Pathol.* 2022;126:63–76.
72. Dubbink HJ, Atmodimedjo PN, van Marion R, Krol NMG, Riegman PHJ, Kros JM, et al. Diagnostic detection of allelic losses and imbalances by next-generation sequencing. *J Mol Diagn.* 2016;18(5):775–86.
73. McAleenan A, Kelly C, Spiga F, Kernohan A, Cheng HY, Dawson S, et al. Prognostic value of test(s) for O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation for predicting overall survival in people with glioblastoma treated with temozolomide. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;CD013316.pub2
74. Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol (Berl).* 2015;130(6):815–27.
75. Dubbink HJ, Atmodimedjo PN, Kros JM, French PJ, Sanson M, Idbaih A, et al. Molecular classification of anaplastic oligodendroglioma using next-generation sequencing: A report of the prospective randomized EORTC Brain Tumor Group 26951 phase III trial. *Neuro-Oncol.* 2016;18(3):388–400.