

Dr Eduardo Carlos Salido Ruiz coordinador del Grupo de Investigación Patología Celular y Molecular adscrito a la Titulación Máster en Biomedicina por la ULL

### **CERTIFICO**

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado “Fusión KIAA1549: nuevo biomarcador diagnóstico en el Astrocitoma Pilocítico” ha sido realizado bajo mi supervisión por D<sup>a</sup>/D Amanda León Hernández, matriculada en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico 2021/2022
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, doy mi consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de la memoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a 1 de julio del 2022



Dr. Eduardo Salido Ruiz

# FUSIÓN KIAA1549-BRAF: NUEVO BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO EN EL ASTROCITOMA PILOCÍTICO



Amanda León Hernández  
Tutor: Eduardo Ruiz Salido  
Grupo: Patología celular y molecular  
Máster en Biomedicina  
Curso Académico 2021/2022

Índice

1. Resumen/ <i>Abstract</i> .....	3
2. Introducción .....	4
Astrocitoma pilocítico.....	4
2.1. Localización.....	4
2.2. Síntomas .....	4
2.3. Tratamiento.....	5
2.4. Pronóstico .....	5
2.5. Perfil genético.....	6
2.6. Mecanismo molecular asociado a las alteraciones genéticas diagnósticas ...	6
3. Hipótesis y objetivos .....	11
4. Materiales y métodos .....	12
4.1. Pacientes .....	12
Extracción de ARN/ADN .....	12
De ARN a cADN .....	13
4.2. Análisis molecular de la fusión BRAF-KIAA1549.....	13
Gel de electroforesis .....	15
Gel de acrilamida .....	15
4.3. Métodos para determinar V600E en BRAF.....	15
Purificación del ADN .....	15
PCR para la determinación de V600E.....	16
Pirosecuenciación .....	16
5. Resultados .....	16
Determinación de la fusión KIAA1549:BRAF .....	16
Determinación de la mutación V600E de BRAF .....	21
6. Discusión.....	23
7. Conclusiones .....	25
8. Bibliografía .....	29

## 1. Resumen/*Abstract*

El astrocitoma pilocítico (AP) es un tumor de bajo grado, el cual representa un 5% dentro de los tumores del sistema nervioso central. Recientemente, la Organización mundial de la salud (OMS) ha publicado una nueva clasificación de los tumores del SNC basada en la caracterización molecular, en el cual se describen dos mutaciones para el diagnóstico de AP, la fusión de los genes KIAA1549: BRAF y la mutación puntual V600E del gen BRAF. El diagnóstico diferencial entre el astrocitoma pilocítico y el astrocitoma difuso de bajo grado no es trivial, siendo las repercusiones pronósticas muy importantes. De ahí que los servicios de Patología estén inmersos en un proceso de incorporación de determinaciones moleculares para mejorar la precisión diagnóstica. Con este trabajo de fin de máster pretendemos contribuir a este proceso asistencial. Para ello se han seleccionado casos antiguos del servicio de anatomía del Hospital Universitario de Canarias (HUC) a los cuales se ha determinado la fusión KIAA1549: BRAF por medio de RT-PCR, así como, la mutación V600E del gen BRAF por pirosecuenciación. No se obtuvieron resultados positivos para la fusión. Sin embargo, se determinó la mutación puntual V600E del gen BRAF en una de las muestras.

*Pilocytic astrocytoma (PA) is a low-grade tumor that accounts for 5% of central nervous system tumors. World Health Organization (WHO) published a new classification of CNS tumors based on molecular characterizations, in which two mutations are described for diagnosing AP, the fusion of the KIAA1549: BRAF genes, and the V600E point mutation of the BRAF gene. Diagnosis of pilocytic astrocytoma and diffuse low-grade astrocytoma is not trivial, the prognostic consequences are significant. As a result, the Pathology services are incorporating molecular determinations to improve diagnostic accuracy. This master's thesis aims to contribute to this healthcare process. In this study, we selected AP cases from the Hospital Universitario de Canarias (HUC) anatomy to detect KIAA1549: BRAF fusion genes by RT-PCR and the V600E mutation of the BRAF gene by pyrosequencing. We*

*did not get any possible results from KIAA1549: BRAF fusion genes. But, we could detect one case with V600E in the BRAF gene.*

## 2. Introducción

*Global Cancer Observatory* estimó alrededor de 19,3 millones de nuevos casos de cáncer y 10 millones de fallecimientos por cáncer durante el 2020(1).

La clasificación de los diferentes tipos de tumores que afectan al sistema nervioso central (SNC) hasta el 2016, se basaba en características histológicas de los tumores que se complementaba con otras pruebas como la inmunohistoquímica y/o los estudios a nivel ultraestructurales. A partir del 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo una nueva clasificación basada en marcadores moleculares. La aplicación de las técnicas moleculares permitió caracterizar y subclasificar los tumores que afectan al SNC(2).

### Astrocitoma pilocítico

Este estudio se centra en el grupo de los gliomas astrocíticos circunscritos, en concreto en el astrocitoma pilocítico (AP). Este tumor representa el 5% de tumores que afectan al SNC. La incidencia es de 0,91 casos por 100.000 habitantes. AP representa un 17,6% de los casos primarios de tumor cerebral, siendo el glioma más común en niños(3).

#### 2.1. Localización

AP puede aparecer en cualquier punto del eje neural, sin embargo, su localización más frecuente es en el cerebelo (42%). Otros lugares en los que suele aparecer son la región supratentorial (36%), tracto óptico e hipotálamo (9%) y médula espinal (2%)(4).

#### 2.2. Síntomas

La clínica que presentan estos pacientes suele estar relacionada con la compresión que el tumor ejerce en estructuras circundantes al mismo. Dependiendo del lugar donde se encuentre producirá una sintomatología diferente. Si la localización es en torno al sistema de ventrículos cerebrales producirá una obstrucción que se

presenta con dolores de cabeza, hidrocefalia y un aumento de la presión intracraneal. Sin embargo, si se encuentra en el nervio óptico, los pacientes tendrían pérdidas de la visión. Como se ha mencionado anteriormente, la localización más común suele ser cerebelar, por lo que la clínica que presentan estos pacientes está relacionada con trastornos motores(4).

### 2.3. Tratamiento

El tratamiento para los pacientes con un tumor de bajo grado es, principalmente, la resección quirúrgica del tumor. Este subtipo de tumor suele estar bien delimitados por lo que sí hay una extirpación completa del mismo no requiere ninguna terapia adyuvante, pero requiere de seguimiento del paciente mediante técnicas de imagen por si el tumor volviese a aparecer. Sin embargo, la localización del tumor puede afectar al tratamiento ya que, si este aparece en regiones inaccesibles, como en regiones centrales (hipotálamo, tálamo, tracto óptico) no podrán ser extirpadas. Son tres las terapias alternativas basadas en radioterapia, quimioterapia o terapias específicas, las cuales también son administradas también en caso de recidiva(5).

### 2.4. Pronóstico

El pronóstico de este tumor es excelente, más del 90% de los casos tienen una supervivencia superior a los 10 años. Pero como ya se ha mencionado en el apartado anterior, la agresividad del tumor dependerá del lugar donde se localice y de la posibilidad de realizar la resección completa del tumor(4).

El diagnóstico diferencial con el astrocitoma difuso es primordial ya que no tienen el mismo pronóstico. La media de supervivencia del astrocitoma difuso es de 3,9 a 10,8 años, inferior a la que presenta el AP. La morfología de estos tumores en el estudio histológico, en ocasiones, puede ser un método insuficiente para distinguir entre estos dos subtipos de gliomas. De ahí la importancia de la utilización de marcadores moleculares, ya que son distintos para cada uno (6,7).

## 2.5. Perfil genético

En cuanto a la caracterización molecular del AP, la mayor parte de los casos es esporádico, aunque también aparece en mutaciones germinales. Estas mutaciones en la germinal se encuentran en algunos genes como el NF1, característico del síndrome de Noonan y de la lipomatosis encefalocraneocutánea. Las mutaciones más frecuentes en este síndrome son PTPN11 o RAF1 y FGFR1 en la lipomatosis encefalocraneocutánea (3,8).

Por otro lado, el AP se asocia con anomalías genéticas somáticas (no heredadas) de genes que participan en la vía MAPK. Se ha descrito recientemente un nuevo biomarcador que permite el diagnóstico del 66% de los APs. Se trata de una fusión descrita por primera vez por Jones et al. producida por una duplicación en tándem de la región 7q34. Dicha mutación produce un nuevo gen de fusión formado por BRAF y KIAA1549 (3,5,8–10).

Otras alteraciones genéticas que podrían estar relacionadas en el desarrollo de AP, son las que afectan al gen BRAF (p.V600E e inserciones); mutaciones en KRAS; fusiones o mutaciones en FGFR1; poco frecuentes fusiones en la familia NTRK; fusiones en RAF1, entre otras. Sin embargo, estas alteraciones genéticas no son específicas del AP, estas también pueden encontrarse en otro tipo de tumores como en el tumor glioneuronal leptomeníngeo difuso, en el cual se ha hallado la fusión entre KIAA1549:BRAF. Incluso alteraciones genéticas en el gen BRAF en el tumor cerebral xantastrocitoma pleomórfico (5,8,10,11).

## 2.6. Mecanismo molecular asociado a las alteraciones genéticas diagnósticas

Para estudiar la implicación de la fusión entre BRAF y KIAA1549, así como la mutación puntual en BRAF (p.V600E), es necesario describir las características de cada uno de los genes implicados.

### 2.6.1. Gen BRAF

*Serine/threonine-protein kinase B-raf* es una proteína codificada por el gen BRAF (ID:673) localizado en 7q34 que cuenta con un total de 23 exones. Esta proteína está formada por 766 aminoácidos con un peso de 84.437 Da. Participa en la vía de señalización de las MAPK/ERK, la cual está implicada en la división celular,

diferenciación y secreción. Se ha descrito anteriormente una mutación puntual, V600E, identificada en otros cánceres como en melanoma, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, entre otros(12–14). La expresión de esta proteína es inespecífica, los niveles de expresión en diferentes tejidos son parecidos (figura 1) (15).

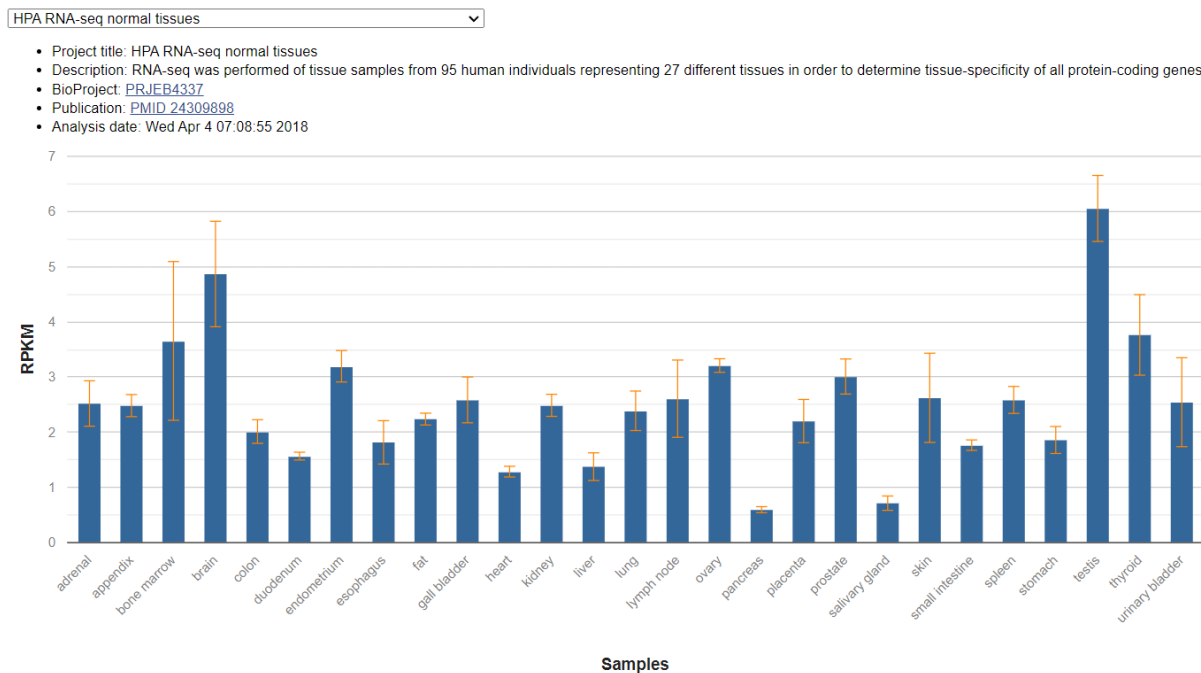


Figura 1. Representación gráfica de los niveles de expresión del gen BRAF en diferentes tejidos obtenidos a partir el proyecto HPA ARN-seq normal tissues. La expresión del gen BRAF es superior en tejidos como testículos y cerebro, mientras que está reducida en la glándula salivar y páncreas con respecto a otros tejidos(15).

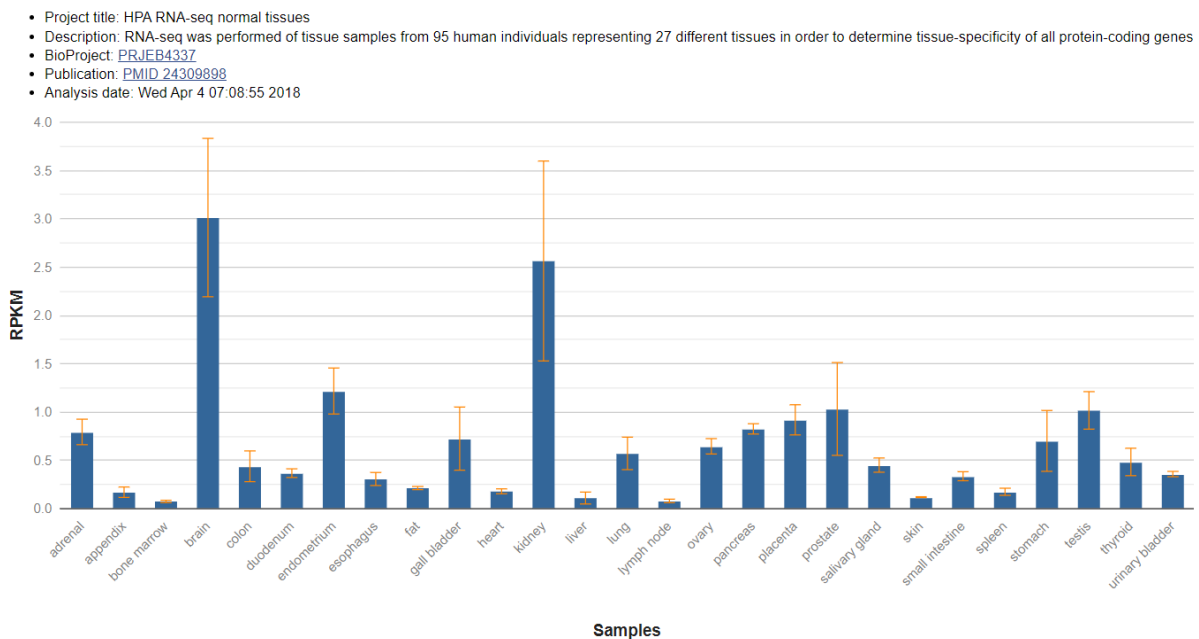
### 2.6.2. Gen KIAA1549

El gen KIAA1549 (ID: 57670) se localiza en el cromosoma 7q34 y cuenta con un total de 20 exones. La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de las UPF0606. Está formada por un total de 1934 aminoácidos. La función de la KIAA1549 es poco conocida, se le ha relacionado con fotorreceptores de membrana lo que podría señalar que participa en la transducción de la señal captada por el fotorreceptor al interior celular(16,17).



La expresión de este gen no es homogénea en todos los tejidos, presenta una alta expresión en cerebro y riñón con respecto a otros tejidos (figura 2). Cabe destacar que la proteína de fusión resultante de la translocación KIAA1549-BRAF está regulada por el promotor de KIAA1549, lo que indica que la expresión de la proteína será elevada en el SNC(9,18).

La proteína codificada por el gen KIAA1549 es poco conocida. Sin embargo, la presencia de mutaciones en este gen están asociadas a dos patologías diferentes. Por un lado, la retinitis pigmentaria donde se describen variantes del gen. Y por otro lado, la fusión de KIAA1549 con BRAF, en el AP(16). En relación con nuestro trabajo, la función del gen codificado por KIAA1549 es poco relevante ya que nos centramos en el resultado de una proteína de fusión cuyo componente activo es BRAF (que pierde su dominio regulador) y la aportación de KIAA1549 se limita a controlar la expresión



génica con su promotor, enhancer...

Figura 2. Representación de la expresión del gen KIAA1549 en diferentes tejidos obtenidos a partir el proyecto HPA ARN-seq normal tissues. Destaca la alta expresión de este gen en los tejidos de cerebro y riñón, mientras que hay una menor expresión en los tejidos de médula ósea, linfonodos, piel, etc(19).

### 2.6.3. Fusión KIAA1549: BRAF

Tanto el gen KIAA como BRAF se encuentran localizados en el mismo cromosoma separados por 2Mb. Se observaron 3 puntos de roturas y fusión desencadenados por una duplicación en tándem o una delección e inserción de la región del genoma que contiene al gen BRAF y KIAA1549. Esta alteración del genoma conlleva a la pérdida de los 9 primeros exones del gen BRAF, el cual codifica para el dominio regulador de la actividad de la quinasa (Figura 3). Por lo que el extremo 5' del gen BRAF se pierde y es reemplazado por parte del gen KIAA1549. A causa de esta alteración, la actividad de la proteína resultante es una activación constitutiva de la misma, promoviendo así la activación continuada de la vía de señalización de las MAPK(3,8–10,20).

En la mayoría de los casos, la fusión ocurre entre el exón 15 o 16 de KIAA1549 y el exón 9 de BRAF. Cabe destacar que dicha fusión provoca que la regulación de la transcripción de la proteína BRAF sea regulada por el promotor de la proteína KIAA1549, la cual parece expresarse mayormente en el cerebro (figura 2).

La mutación puntual del gen BRAF, en concreto la V600E, que supone un cambio de una valina por una isoleucina en el aminoácido 600 de la proteína. En concreto ocurre en el triplete CTC, en el cual la timina es sustituida por adenina, resultando en CAC, que codifica para un aminoácido diferente. Este aminoácido forma parte de la región catalítica de la proteína BRAF (figura 4), la cual promueve la activación constitutiva de la proteína. Por lo que concluimos que tanto la mutación puntual como la fusión son capaces de inducir una activación de la proteína BRAF de forma continuada en el tiempo, sin la posibilidad de inactivarse. Consecuentemente, la vía de las MAPK estará constitucionalmente activa, esto promueve la transcripción de los genes implicados en la proliferación celular (figura 4)(3,5,8,11,21).

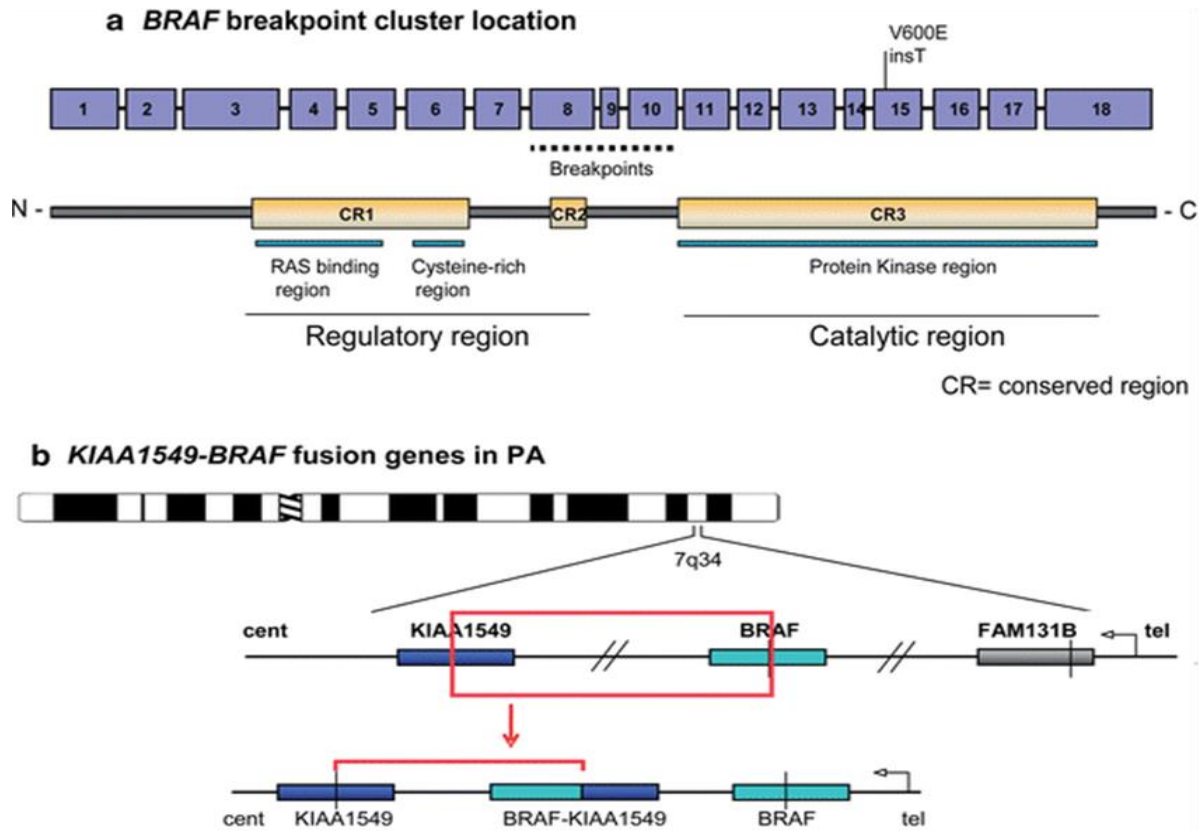


Figura 3. *Fusión de KIAA1549 y BRAF*. El punto de rotura del gen ocurre en medio de la región catalítica que es la que codifica para la actividad quinasa y la región reguladora (a). Esta última es la que se pierde durante este proceso. La región catalítica (conservada) se fusiona con el gen KIAA1549, que ahora forma el extremo N-terminal de la proteína BRAF. Esto produce una proteína de fusión, regulada por el promotor de KIAA1549 y conservando la región catalítica de BRAF (b)(20).

Por último, para entender el mecanismo por el cual las mutaciones descritas anteriormente tienen un papel importante en el desarrollo del tumor, es necesario explicar la vía de las MAPK. Esta vía de señalización celular juega un papel importante en la proliferación, diferenciación, transformación, desarrollo y apoptosis de las células, tanto en células sanas como entumorales. Esta vía de señalización celular implica la activación de una serie de proteínas con actividad quinasa, entre ellas la proteína BRAF(figura 4)(3,22).

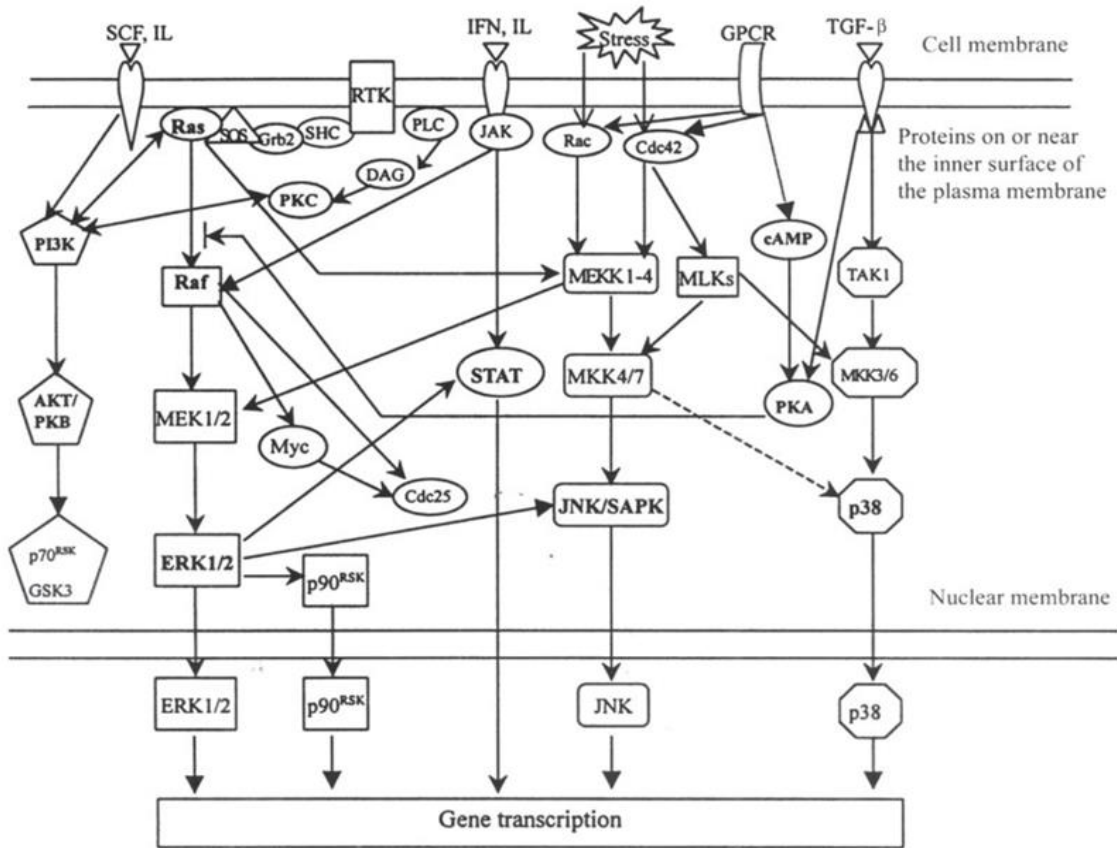


Figura 4. Señalización de la vía de las MAPK. La activación de esta vía puede ser mediante la unión de un ligando a un receptor o por medio de condiciones de estrés. El resultado es la transcripción de genes que tienen una función en concreto(22).

### 3. Hipótesis y objetivos

Este estudio se propone identificar la fusión de KIAA1549:BRAF como análisis complementario para el diagnóstico del astrocitoma pilocítico. Así, como la determinación de la mutación puntual V600E en BRAF presente en un 9% de los casos diagnosticados como AP.

El **objetivo general** es determinar la fusión de KIAA1549:BRAF y la mutación puntual V600E en casos diagnosticados como AP.

Los **objetivos específicos** de este estudio se muestran a continuación:

- Estudiar la función de cada gen y describir la ventaja que confiere dicha fusión/mutación a la progresión tumoral.
- Identificar y seleccionar los casos de AP.

- Determinar la fusión por RT-PCR.
- Identificar la mutación V600E de BRAF mediante pirosecuenciación.
- Analizar los datos obtenidos y establecer las conclusiones del estudio.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Pacientes

Se seleccionó una cohorte de 18 pacientes intervenidos y diagnosticados en el Hospital Universitario de Canarias (HUC), Santa Cruz de Tenerife. Los casos recopilados corresponden a pacientes diagnosticados con PA desde el año 2013 hasta la actualidad, con rango de edad X-Y. Además, se han rescatado otros datos correspondientes al tratamiento y otras variables interesantes para el estudio. La anonimización de los pacientes fue preservada durante todo el estudio, se trabajó con un número de biopsia asignado por el laboratorio de Anatomía Patológica de HUC.

Durante el estudio, se descartaron 6 casos por diversas causas como escasez del material, muestra con alta proporción hemática o necrosis, incluso algunos de ellos no se encontraban en el servicio debido a que se complementó el estudio fuera del propio hospital.

Como controles positivos, se incorporaron 3 muestras de otros hospitales en los que se había diagnosticado previamente la fusión KIAA1549:BRAF mediante *Fluorescence in situ hybridization* (FISH). Fueron anonimizadas con las siguientes referencias: ME1. ME2 y ME3.

### Extracción de ARN/ADN

La extracción de ARN se realizó a partir de muestras fijadas en formol al 4% y preservadas en parafina. La muestra seleccionada debe contener al menos un 30% de células tumorales para poder determinar dichas fusiones. Se debe seleccionar el área representativa tumoral de la muestra, excluyendo zonas de necrosis y hemáticas para obtener una muestra lo más homogénea posible. Para ello, se visualiza la muestra bajo

microscopía óptica y se selecciona el área con mayor porcentaje de células tumorales. Posteriormente, se realiza un raspado de dicha área con un bisturí u objeto afilado hasta obtener la cantidad suficiente. Dependiendo del área tumoral afectada se realizan entre 8-12 raspados, siendo para un área mayor de 8 raspados y áreas donde hay poca superficie 12. No existe una medida exacta que nos permita decidir la cantidad de material que recogemos del bloque. Posteriormente, se recogen las virutas de parafina y tumor y se incorporan a un eppendorf de 1,5 ml.

Se utilizó el kit comercial para la extracción de ARN de la casa comercial Myriad. El cual comienza por desparafinar las muestras seleccionadas por medio de la utilización de un buffer a una incubación a 70°C durante 30 minutos. Posteriormente, se incubó con proteinasa K a 65°C durante 30 minutos. Seguidamente, se usaron esferas magnéticas de sílice que permitieron la interacción con el ARN. A continuación, se realizaron lavados con diferentes buffers. Durante la adición de este primer buffer de lavado se pudo recolectar el ADN que quedó suspendido en el sobrenadante. Este ADN se utilizaría más tarde para la determinación de la mutación puntual (V600E) del gen BRAF. Finalmente, se utilizó un buffer de elución que facilitó la obtención del ARN purificado.

#### De ARN a cADN

Una vez obtenido el ARN, una parte del volumen obtenido se sometió a la acción de la transcriptasa reversa con el fin de convertir estas moléculas a cADN. Para ello se incubó el ARN con la transcriptasa reversa a temperatura ambiente durante 30 minutos y un segundo periodo de incubación en un termobloque a 42°C durante 30 minutos.

#### 4.2. Análisis molecular de la fusión BRAF-KIAA1549

Una vez obtenido el cADN se determinó la presencia de la expresión de BRAF a partir de la utilización de la pareja de *primers*: reverse del exón 7 del BRAF (5'AAGGGGATGATCCAGATGTTAGG 3') y el forward del exón 6 del BRAF (5'TTGTGACTTTTGTGCGAAAGCTGC 3') bajo las condiciones: desnaturalización 95°C durante 15 minutos; 30'' a 94°C; 30'' a 72°C; extensión final 10 minutos a 72°C.

Seguidamente, se llevó a cabo un gel de electroforesis para visualizar y analizar los amplicones obtenidos.

En base a los resultados obtenidos en la PCR anterior, se seleccionaron los casos donde se observó amplificación y se realizó una segunda PCR para la determinación de las tres fusiones. Los *primers* utilizados para la determinación de esta fusión fueron los diseñados para las diferentes fusiones: exón 16 de KIAA1549 y el exón 11 de BRAF; exón 15 de KIAA1549 y el exón 9 de BRAF y exón 16 de KIAA1549 y el exón 11 de BRAF. Estos *primers* son los utilizados por Jones et al. para la determinación de dicha fusión(9). Las condiciones en las que se realizó la PCR fueron las mismas que la anterior.

Ensayo	Especificidad	Primer	Secuencia (5'→3')
Fusión KIAA1549 ex16 y ex11 BRAF (A)	KIAA1549 exón 16	Fwd	AAACAGCACCCCTTCCCAGG
	BRAF exón 11	Rev	GTTCCAAATGATCCAGATCCAATTC
Fusión KIAA1549 ex15 y ex9 BRAF (B)	KIAA exón 15	Fwd	CGGAAACACCAGGTCAACGG
	BRAF exón 9	Rev	CTCCATCACCACGAAATCCTTG
Fusión KIAA1549 ex16 y ex9 BRAF (C)	KIAA1549 exón 16	Fwd	AAACAGCACCCCTTCCCAGG
	BRAF exón 9	Rev	CTCCATCACCACGAAATCCTTG

Tabla 1. Descripción de los primers utilizados para la determinación de la fusión *KIAA1549:BRAF*. Esta tabla refleja los 3 puntos de rotura del ARNm descritos como A, B y C, que incluyen las diferentes combinaciones de los exones más frecuentes de los genes KIAA1549 y BRAF que describen la fusión.



### Gel de electroforesis

Para visualizar los fragmentos y el tamaño correspondientes a la amplificación realizada por RT-PCR. Se realiza una electroforesis en gel de agarosa 2.0%. Para ello, se utilizó 0,8 g de agarosa y 40 ml de TBE al 5%. Una vez diluido se añadió 20 uL de bromuro de etidio. Una vez cargado el gel con las muestras se utilizó una corriente de 120 mV durante 30 minutos. El resultado del gel fue visualizado por medio de Gel Doc EZ Imager (BIO RAD).

### Gel de acrilamida

Fue necesario la utilización de un gel de acrilamida para verificar 2 casos positivos para la fusión tipo B. Se realizó un gel de acrilamida se utilizó 15 ml de PAGE, 50 uL de Aps u 10 uL de TEMED. Una vez cargado el gel con las muestras se utilizó una corriente de 125 mV durante 30 minutos El resultado del gel fue visualizado por medio de *Gel Doc EZ Imager* (BIO RAD).

## 4.3. Métodos para determinar V600E en BRAF

### Purificación del ADN

La obtención del ADN se realizó a partir del protocolo de extracción del ARN, durante el primer paso de lavado. Se utilizó el kit comercial de *DNA Sample Preparation Kit*, de la casa comercial Roche, para la purificación del ADN. Este kit permite la purificación del ADN por medio de columnas de fibra de vidrio. Estas columnas permiten la retención del ADN y la elución de sustancias como sales, proteínas y otros desechos que se eliminan durante el proceso de centrifugación. Se realiza mediante el uso de dos buffers de lavado: el primero Buffer Tris-HCL (64% de hidrocloreuro de guanidina) y un segundo buffer de Tris-HCl (cloruro sódico) que se centrifugaron a 8.000 x g durante 1 minuto. Y finalmente, un buffer de elución que permite separar el ADN de la columna que es un buffer de Tris-HCl a 0,09% de azida sódica. Para este último paso, se incubó la columna con el buffer durante 5 minutos a T° ambiente y posteriormente se realizó un centrifugado a 8.000 x g durante 1 minuto.



## PCR para la determinación de V600E

Una vez purificado el ADN, se amplificó la región que contiene la mutación V600E del gen BRAF a partir de la utilización de la siguiente pareja de *primers*: TGATTTTGGTCTAGCTACA y bio-TCCAGACA ACTGTTCAA ACTGAT. Uno de los *primers* lleva incorporada biotina, la cual permite seleccionar una de las hebras del ADN amplificado para su posterior estudio por pirosecuenciación. Las condiciones en las cuales se llevó a cabo la amplificación fue la siguiente: desnaturalización 95°C durante 15 minutos; 20'' a 94°C; 30'' a 53 °C y 30'' a 72°C en un total de 40 ciclos. La extensión final se basa en 5 minutos a 72°C.

## Pirosecuenciación

Los amplicones obtenidos mediante la PCR anterior se usaron para la determinación de la mutación V600E del gen BRAF. Esta mutación se analizó por medio del método de pirosecuenciación. Se preparó una mezcla de 30 uL de agua, 38 uL de *binding buffer*, y 2 uL de estreptavidina-agarosa. La estreptavidina formará un complejo con la biotina que hace posible la separación de una de las hebras para su posterior secuenciación. Para ello es necesario la incubación de 10uL del producto de PCR con 70 uL de la mezcla preparada durante 5 minutos a 1400 rpm en un termoagitador. Seguidamente, se hace pasar por una serie de soluciones de: etanol al 70%, *denaturing buffer* y *washing buffer*. Una vez que se han separado y seleccionado una de las hebras, la cual contiene biotina, se colocan en un pocillo que contiene 25 uL de *annealing buffer* y 0,75 uL de *primers* de secuenciación (TGATTTTGGTCTAGCTACA).

Para realizar la pirosecuenciación se utilizan una serie de reactivos que se cargan en el pirosecuenciador, estos son las enzimas, los nucleótidos y el sustrato.

## 5. Resultados

### Determinación de la fusión KIAA1549:BRAF

Previamente a la detección de la fusión de KIAA1549:BRAF, se determinó la presencia del mRNA de BRAF mediante la amplificación de la región que abarca los exones 7 y 6 a partir del ARN obtenido. Para ello, se seleccionaron las muestras que

presentaban una mayor concentración de ARN. Siendo las primeras en determinarse KB1; KB3; KB5; KB7 y KB10 (figura 5).

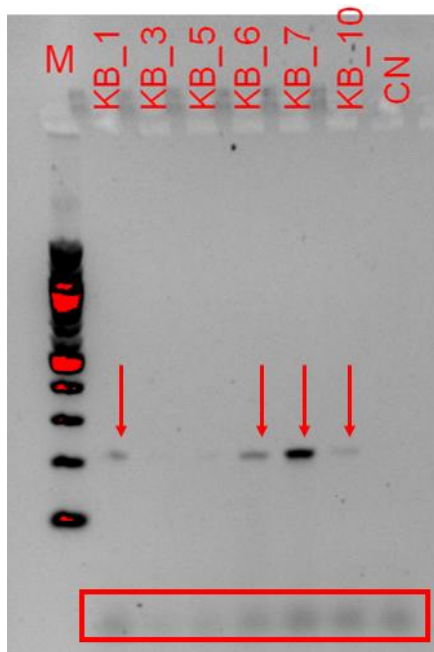


Figura 5. Gel de electroforesis de las muestras con mayor concentración de ARN. Señalado con flechas en rojo, el producto de amplificación del ARN de la región entre los exones 6-7 de BRAF de las muestras KB1, KB6, KB7 y KB10. Al obtenerse producto de amplificación, estas muestras presentan una buena calidad del ARN y son seleccionadas para la determinación de la fusión de KIAA1549:BRAF. Sin embargo, las muestras KB3 y KB5 presentan una baja calidad o menor concentración de ARN ya que no se aprecia producto de amplificación del ARN de BRAF. En el recuadro en rojo se refleja los primer dimers.

Esta determinación se utilizó como *check point*, valorando así la calidad del ARN de cada muestra. De forma que, aquellas muestras no amplificaron durante la primera PCR, se duplicó el volumen de ARN por si la causa de la no obtención de los amplicones fuese por una concentración baja de ARN. Aquellas muestras que no amplificaron en esta segunda PCR fueron descartadas, asumiendo mala calidad del ARN obtenido (Figura 6).

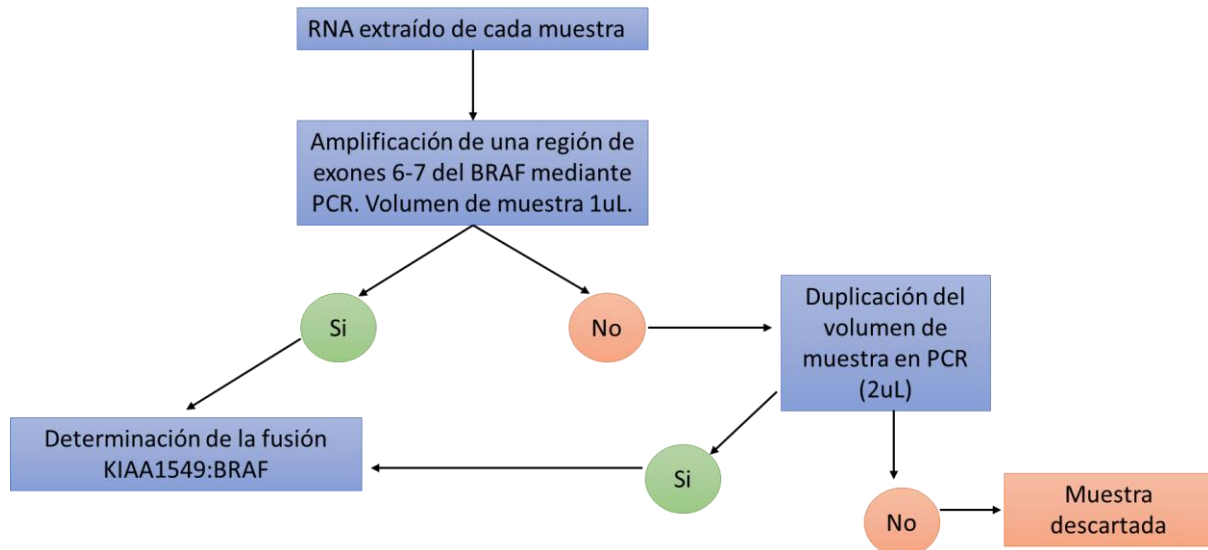


Figura 6. Esquema de la metodología utilizada para la valoración de la calidad de ARN extraído.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las muestras que no amplificaron bajo las condiciones de la primera PCR para la determinación de la calidad del ARN por medio de la amplificación de la región entre los exones 6-7 de BRAF, se realizó una segunda PCR duplicando el volumen de muestra utilizado. En este caso, se realizó para las muestras KB3 y KB5 (Figura 7).

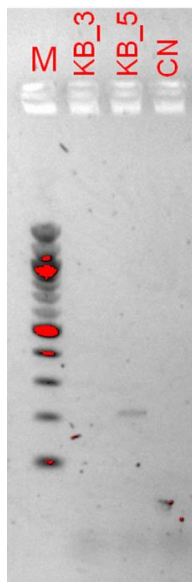


Figura 7. Gel de electroforesis de las muestras KB3 y KB5. En este caso, únicamente KB5 mostró un producto de amplificación de la región entre los exones 6-7 de BRAF en ARN. Por esta razón KB5 se incluyó en el estudio. Sin embargo, KB3 no presentó producto de

amplificación en la segunda PCR mencionada, por esta razón, se descartó dicha muestra para el estudio de la fusión.

Una vez seleccionado los casos para este estudio, el ARN de cada muestra pasó a cADN para la determinación de la fusión mediante una PCR. Los *primers* utilizados son específicos para las diferentes fusiones (A, B y C) (ver en tabla 1). Es por ello, que se estudió cada posible tipo de fusión en cada una de las muestras. En las cinco primeras muestras, la muestra 2 y 4 fueron posibles positivos para la fusión tipo B, la cual implica al exón 15 de KIAA1549 y al exón 9 de BRAF (figura 9). Se realizó un gel de acrilamida con estas 2 (KB2 y KB4) muestras para comprobar que fueran positivas ya que permite una mejor visualización de la banda y una discriminación de fragmentos más pequeños (figura 10). Los resultados de este gel fueron negativos, por lo que ninguna de las 5 primeras muestras fue positiva.

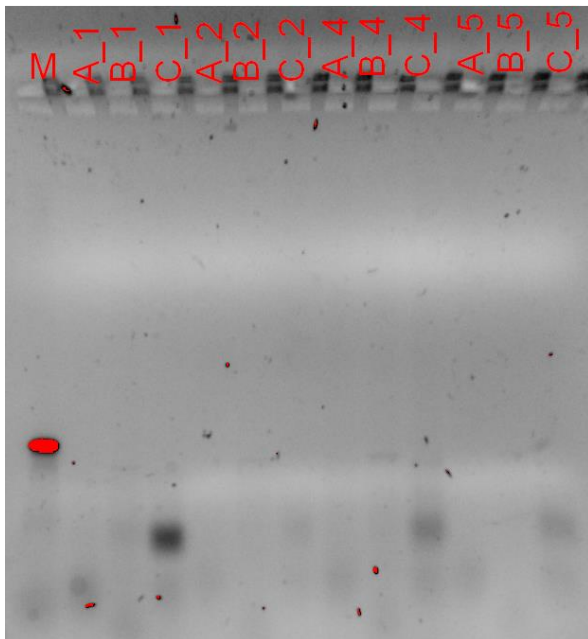


Figura 9. *Gel de agarosa al 2% del producto de amplificación la fusión de BRAF. Se observan al menos 2 bandas tenues del producto de PCR en las muestras KB2 y KB4, en la imagen referenciadas como B\_2 y B\_4 respectivamente. Lo cual indica que podrían ser positivas para la fusión.*

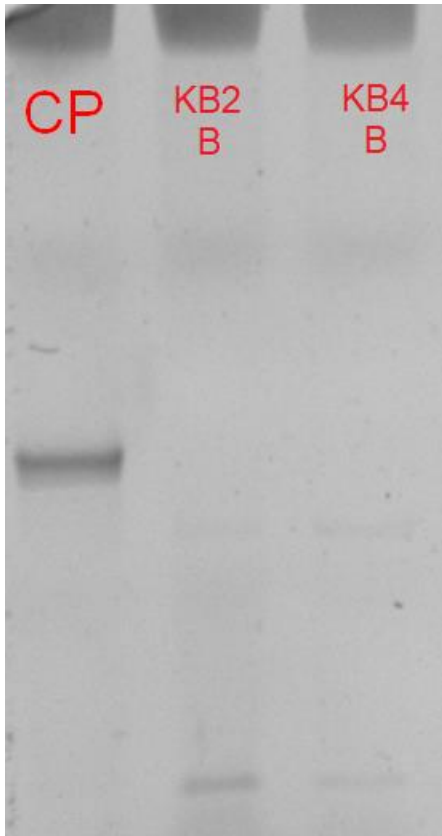


Figura 10. *Gel de electroforesis (acrilamida) con las muestras KB2 y KB4. Se muestra que ni KB2 ni KB4 para la fusión tipo B se observó una banda a la altura de CP (control positivo). Por lo que se determinó que ambas muestras son negativas para la fusión.*

Se realizó el análisis con el resto de las muestras. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos para la fusión en ninguna de las muestras tal y como se muestran en el gel de electroforesis de las muestras KB9, KB11 y KB13 (Figura 11).

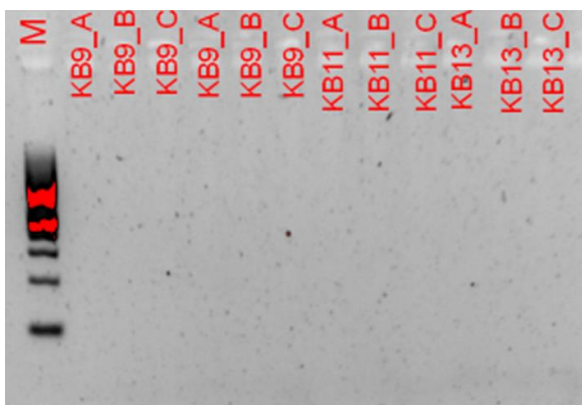


Figura 11. *Gel de electroforesis (agarosa 2%) para la identificación de la fusión del gen KIAA1549:BRAF en las muestras KB9, KB11 y KB13. No se identificó fusión en las muestras KB9, KB11 y KB13, no se obtuvo producto de amplificación en ninguno de los casos.*

También se realizó el estudio de la fusión KIAA1549:BRAF en las muestras externas (ME1, ME2 y ME3) por RT-PCR. En estas muestras ya se había identificado la fusión por medio de FISH. En todos los casos se pudo determinar la fusión. Cabe destacar, la presencia de más de un tipo de fusión en una única muestra como es el caso de la muestra 1, en la cual tanto la fusión de tipo A como B están presentes (figura 12).

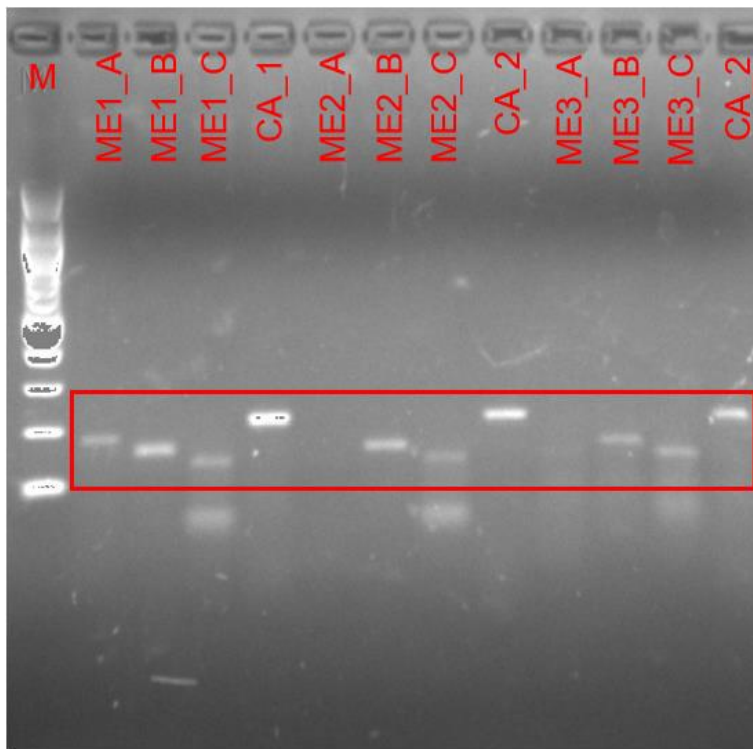


Figura 12. *Gel de agarosa al 2% para la determinación de la fusión en las muestras exteARNs (ME). En el rectángulo rojo se señala el rango entre 100-300 pares de bases. Se obtuvo resultados positivos para las fusiones de tipo A y B para ME1. Y, en ME2 y ME3 se determinó la existencia de la fusión de tipo B. (CA: control de amplificación en el que se determinó el gen BRAF no fusionado).*

#### Determinación de la mutación V600E de BRAF

El siguiente paso en el estudio fue comprobar si existía una mutación puntual en BRAF, en concreto, la V600E. En este caso, se utilizó una fracción intermedia del

proceso de purificación del ARN: el sobrenadante de lisado que queda después de usar las bolas magnéticas que capturan el ARN. Este sobrenadante se sometió a un proceso de purificación con columnas que capturan ADN y, seguidamente, se cuantificó el ADN para cada muestra. La determinación de la concentración de ADN es necesaria para el diseño de la PCR que amplifica el fragmento de ADN que contiene la mutación V600E del gen BRAF.

El producto obtenido de la PCR anterior se utiliza para la determinación de la mutación V600E de BRAF mediante pirosecuenciación. Para considerar que la muestra es positiva para la mutación V600E, debe tener una frecuencia alélica de adenosina (A) en esa posición superior al 10%. Se identificó que la en la muestra KB1 tiene una frecuencia alélica del 17% para el nucleótido A). La sustitución de la timina (T), que es el nucleótido wild type, por la adenosina produce un cambio del aminoácido de valina a isoleucina en la posición del aminoácido 600 en la proteína BRAF. Es por ello, que KB1 se considera positiva para la mutación V600E (figura 10). Mientras que el resto de las muestras no llegaban a un porcentaje de mutación de los alelos representativo (>10%) para determinar que la muestra era positiva, como es el caso que se presenta en la muestra KB2 (figura 11).

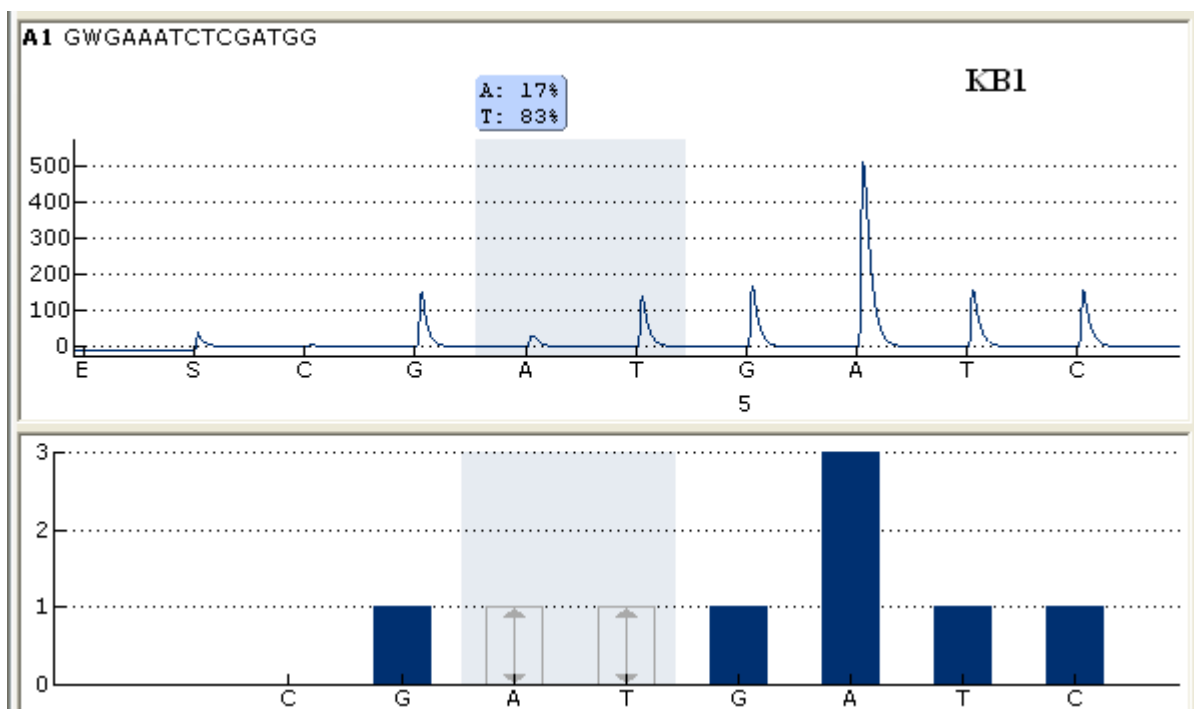




Figura 10. *Resultados de la pirosecuenciación de la muestra KBI.* Se identifica que en el triplete CTC, existe una sustitución de T>A, el cual resulta en CAC con una frecuencia alélica del 17%. Dado este resultado se considera positivo para la mutación V600E (FR (A) >10%).

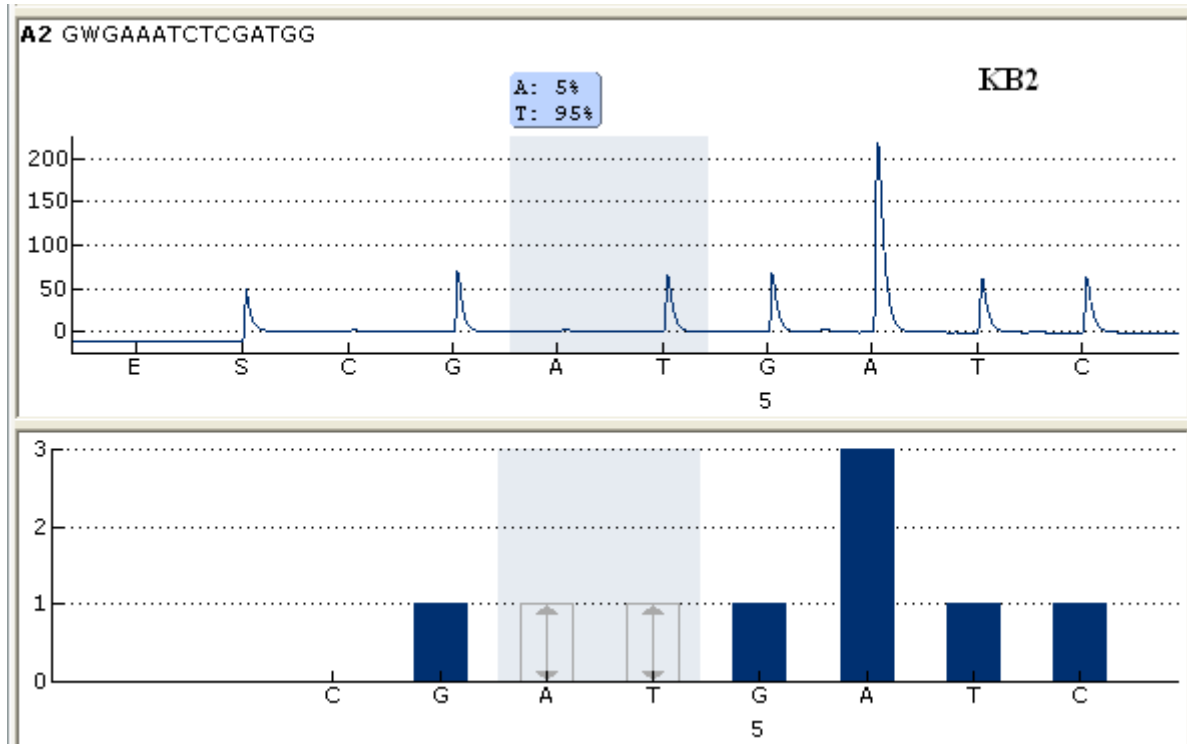


Figura 11. *Resultados de la pirosecuenciación para la muestra KB2.* Se identifica que el 95% de la frecuencia alélica es C, mientras que un 5% de la frecuencia alélica es A. Dado este resultado se considera negativo para la mutación V600E (FR (A) <10%).

## 6. Discusión

La determinación de la fusión KIAA1549:BRAF tiene un gran impacto en el diagnóstico del AP, ya que en ocasiones el diagnóstico diferencial con el astrocitoma difuso puede ser complejo. En vista de los resultados obtenidos en este estudio no podemos afirmar que los casos de AP diagnosticados en el HUC contienen dicha fusión. Habría que recurrir a otros métodos analíticos que permitan detectar esta fusión. Una de las opciones sería la técnica FISH mencionada anteriormente. Esta técnica permitiría la determinación de la fusión por medio del uso de sondas complementarias a regiones de los genes BRAF y KIAA1549. Se intentó incluir este método en el estudio, pero no obtuvimos la sonda a tiempo para realizar el



experimento. La ventaja de incluir la técnica FISH en este estudio es detectar un posible error en los métodos utilizados. Al aplicar dicha técnica esperaríamos encontrar algún caso positivo de los estudiados.

A partir de los resultados obtenidos comenzamos a pensar en cuáles podrían ser los posibles errores cometidos en el método de análisis de las muestras. Como posibles causas implicadas en la no detección de la fusión podrían ser la poca cantidad de material biológico, ya que son biopsias pequeñas del SNC. Otra causa es el tiempo que ha transcurrido desde que se biopsia la muestra hasta que se realiza la técnica, ya que hay muestras que se obtuvieron hasta hace casi 10 años atrás, por lo que pudo ser que el ARN presente en estas se degradara.

Otra de las causas podría ser la contaminación con ARNasas presentes en el ambiente, incluso en el material utilizado, que puedan degradar el ARN. También, podría ser interesante probar otros métodos de extracción del ARN ya que en algunas de las muestras no pasaron el control de calidad, en concreto KB3. Así podríamos comprobar cuál de los métodos nos permite obtener una mejor calidad y cantidad del ARN. Todas estas causas podrían ser las posibles razones por las que no se pudo detectar la fusión. Algunas de estas razones son meramente especulativas ya que no podemos saber al 100% de lo que ha ocurrido durante las sucesivas etapas de los experimentos.

Otra consideración es el número de muestras incluidas en el estudio. Quizás las muestras que se seleccionaron no contenían dicha fusión. Recurrir a muestras más antiguas que el año 2013 no sería buena idea, ya que a mayor tiempo conservada menor calidad y cantidad tendrá la muestra. Por otro lado, debemos considerar la baja incidencia de estos tumores en la población. Una solución es incluir biopsias de pacientes diagnosticados en otros hospitales. Durante la realización de los experimentos pensamos en ello. Sin embargo, esto es un procedimiento complejo y tedioso ya que se requiere de documentación legal para el uso de estas muestras, tanto el consentimiento de los pacientes como el de los hospitales.

Si se pudiese lograr se utilizaría el mismo método analítico utilizado, ya que hemos visto que para las muestras externas funciona dado que hemos sido capaces de

determinar la fusión. Esperando que al aumentar el número de muestras seamos capaces de detectar un mayor número de casos.

Por otro lado, este estudio nos ha permitido detectar un caso de astrocitoma pilocítico con la mutación V600E del gen BRAF, en concreto en la muestra K1 (figura 10). A pesar de que la frecuencia alélica no es elevada, se considera positiva para la mutación ya que es  $>10\%$ . Esto podría ser una gran ventaja para el tratamiento de este paciente, ya que existen dianas terapéuticas específicas para este tipo de mutación, aunque no sea la terapia estándar para el tratamiento del AP. Ante este resultado, sería conveniente estudiar esta mutación puntual en el resto de los AP debido a que se podrían obtener datos interesantes. Como posible estudio futuro, podrían compararse el pronóstico, respuesta terapéutica, crecimiento del tumor, y otras variables de interés clínico y terapéutico, pudiéndonos anticipar al comportamiento de tumor en base a su caracterización molecular.

Hubo una primera intención de estudiar la historia clínica de cada paciente, tomando datos interesantes para el estudio como sería edad, sexo, tamaño del tumor, la evolución de este, la respuesta terapéutica, entre otros. El objetivo era comparar el grupo de pacientes con la mutación puntual V600E en el gen BRAF con respecto a los paciente que presentan la fusión KIAA1549:BRAF. No obstante, los escasos resultados positivos de este estudio no permitieron continuar esta rama del estudio. No obstante, aunque hubiésemos determinado la fusión en al menos 6 de las muestras estudiadas, el análisis de estas variables no sería significativos o representativos debido al reducido número de muestras. Quizás, en un futuro, podría realizarse un estudio en conjunto con otros servicios de anatomía patológica en el cual se pusieran en conjunto todos estos datos de los pacientes con AP, pudiendo así aumentar el número de muestras estudiadas. Esta idea no es exclusiva para estudiar este tipo de tumor, si no que sería interesante aplicar en otros tipos de tumores con baja incidencia e incluso, tumores de alta incidencia, permitiendo así la cooperación y el compartir ideas que ayuden a avanzar en el conocimiento del cáncer.

## 7. Conclusiones

El AP es un glioma de bajo grado que se presenta mayormente en personas menores de 20 años. Es un tumor que se localiza mayormente en el cerebelo y nervio óptico, así como en ganglios basales. Son tumores poco agresivos por lo que el tratamiento más adecuado es la extirpación del tumor. Sin embargo, puede verse comprometido por la localización donde se presente teniendo que recurrir a otros tratamientos, como la radioterapia, para tratar el tumor. Esto tiene una serie de consecuencias para el individuo ya que podría provocar que la radiación induzca nuevas mutaciones y consecuentemente, nuevos procesos proliferativos. De ahí la importancia de estudiar el mecanismo principal por el cual crece el tumor. En este caso, podríamos decir que la vía de las MAPK es la principal vía activada y, por tanto, la que induce el crecimiento del tumor. Recordando lo visto hasta ahora, la activación de esta vía se debe a mutaciones en el gen de BRAF, ya sea por la mutación V600E como por la fusión de este gen con KIAA1549. Por lo que esta proteína podría ser una diana específica para el tratamiento del AP cuando no exista la posibilidad de extirpar el tumor.

BRAF se ha visto implicado en la proliferación celular en otros tipos de tumores y es una diana terapéutica. En concreto la mutación V600E es una diana terapéutica en melanomas. Esto se debe a que la proliferación celular es debido a la actividad constitutiva de la proteína BRAF mutada. Es por ello por lo que en los AP con dicha mutación podrían ser tratados con un inhibidor específico de BRAF como terapia alternativa a la resección quirúrgica del tumor. De hecho, actualmente se encuentran en estudio la combinación de los anticuerpos monoclonales llamados *dabrafenib* y *trametiniv*, que son inhibidores de BRAF, para el tratamiento de astrocitomas de bajo grado.

Por otro lado, el encéfalo es un sistema altamente protegido, el paso de sustancias se ve comprometido por las características de la barrera hematoencefálica. Esto dificulta que ciertos fármacos puedan atravesar esta barrera y llegar al tumor. Además, de los efectos secundarios que conlleva esta terapia.

La identificación de la fusión en gran parte de los AP permite la utilización de la fusión como un marcador diagnóstico. Sin embargo, es necesario el estudio histológico debido a que no todos los PA presentan la mutación, y, además, otros

subtipos de glioma también pueden presentar esta mutación. No obstante, la fusión KIAA1549: BRAF puede ser un biomarcador de diagnóstico diferencial. Es de suma importancia la necesidad de dar un diagnóstico con la mayor exactitud y seguridad ya que esto puede condicionar al tratamiento que recibirá el paciente como aportar otros datos de importancia como por ejemplo el pronóstico. Existe la posibilidad de dar un diagnóstico erróneo, lo que puede conllevar a la administración de un tratamiento equivocado. Esto puede acarrear que el proceso tumoral continúe, empeorando con ello la salud del paciente. Además, de todos los efectos secundarios que se pueden dar.

La adición de las técnicas moleculares permite el descubrimiento, y también la detección de nuevos biomarcadores, ya estén relacionados con el diagnóstico, pronóstico o de respuesta terapéutica. Bajo mi punto de vista, estos son esenciales para prestar un buen servicio sanitario que ayude a mejorar la calidad de vida de las personas y estar cada vez más cerca de la medicina personalizada.

### Agradecimientos

A mi familia y amigos, por animarme a superarme y mantenerme motivada cada día.

También, agradecer su apoyo y constancia cuando más lo he necesitado.

A mi tutor, Eduardo, y a su estudiante de doctorado, Ayelen, por su amabilidad, por su paciencia y por el tiempo y esfuerzo que dedican a la enseñanza.

A la Universidad de La Laguna y al Hospital Universitario de Canarias, por prestar sus instalaciones y los medios necesarios para la realización de este proyecto.

Y, por último, a cada persona que pone el corazón y contribuye al avance científico día a día con el objetivo de ayudar a las personas en el camino de su enfermedad.

## 8. Bibliografía

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021;149(4):778–89.
2. 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* [Internet]. 2021 Aug 2 [cited 2022 Apr 1];23(8):1231–51. Available from: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/23/8/1231/6311214>
3. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2022 Jun 4];118(5):1739–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18398503/>
4. Collins VP, Jones DTW, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2015 Jun 26 [cited 2022 Jun 25];129(6):775. Available from: </pmc/articles/PMC4436848/>
5. Chalil A, Ramaswamy V. Low Grade Gliomas in Children. *J Child Neurol*. 2016;31(4):517–22.
6. Korshunov A, Meyer J, Capper D, Christians A, Remke M, Witt H, et al. Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2009 Jun 19 [cited 2022 Jun 29];118(3):401–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-009-0550-z>
7. Tunthanathip T, Ratanalert S, Sae-Heng S, Oearsakul T, Sakaruncchai I, Kaewborisutsakul A, et al. Prognostic Factors and Nomogram Predicting Survival in Diffuse Astrocytoma. *J Neurosci Rural Pract* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Jun 29];11(1):135. Available from: </pmc/articles/PMC7055629/>
8. Srinivasa K, Cross KA, Dahiya S. BRAF Alteration in Central and Peripheral

- Nervous System Tumors. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Sep 15 [cited 2022 Jun 2];10. Available from: [/pmc/articles/PMC7523461/](#)
9. Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2022 Apr 1];68(21):8673. Available from: [/pmc/articles/PMC2577184/](#)
  10. Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, Ma C, Resnick AC, Sievert AJ, et al. Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro Oncol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2022 Jun 29];12(7):621. Available from: [/pmc/articles/PMC2940652/](#)
  11. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, et al. 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* [Internet]. 2011 Mar 29 [cited 2022 Jun 29];121(3):397–405. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-011-0802-6>
  12. Riudavets M, Cascetta P, Planchard D. Targeting BRAF-mutant non-small cell lung cancer: Current status and future directions. *Lung Cancer* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2022 Jun 28];169:102–14. Available from: <http://www.lungcancerjournal.info/article/S0169500222004597/fulltext>
  13. Tang KT, Lee CH. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: Pathogenic Role and Clinical Implications. *J Chinese Med Assoc.* 2010 Mar 1;73(3):113–28.
  14. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med* [Internet]. 2012 May 3 [cited 2022 Jun 28];10(1):85. Available from: [/pmc/articles/PMC3391993/](#)
  15. BRAF B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>
  16. Bruijn SE De, Verbakel SK, Vrieze E De, Kremer H, Cremers FPM, Hoyng CB,

- et al. Homozygous variants in KIAA1549 , encoding a ciliary protein , are associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa. 2018;1–8.
17. KIAA1549 KIAA1549 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57670#gene-expression>
  18. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2014 Feb [cited 2022 Jun 28];13(2):397. Available from: </pmc/articles/PMC3916642/>
  19. KIAA1549 KIAA1549 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Jun 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57670>
  20. Cin H, Meyer C, Herr R, Janzarik WG, Lambert S, Jones DTW, et al. Oncogenic FAM131B-BRAF fusion resulting from 7q34 deletion comprises an alternative mechanism of MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2011 Jun 20 [cited 2022 Jun 3];121(6):763–74. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-011-0817-z>
  21. Faulkner C, Ellis HP, Shaw A, Penman C, Palmer A, Wragg C, et al. BRAF Fusion Analysis in Pilocytic Astrocytomas: KIAA1549-BRAF 15-9 Fusions Are More Frequent in the Midline Than Within the Cerebellum. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2015 Sep 29 [cited 2022 Apr 1];74(9):867–72. Available from: </pmc/articles/PMC4554227/>
  22. Wei Z, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002 121 [Internet]. 2002 [cited 2022 Jun 2];12(1):9–18. Available from: <https://www.nature.com/articles/7290105>