

Biomarcadores en gliomas difusos: del diagnóstico histomolecular a los marcadores circulantes

Montse Puigdelloses, Inés Esparragosa, Marta M. Alonso y Jaime Gállego Pérez-Larraya

Resumen

Los gliomas difusos son los tumores cerebrales primarios malignos más frecuentes. Constituyen un grupo heterogéneo de tumores, con grados de agresividad y pronóstico muy diversos. Durante décadas, la clasificación de los gliomas se ha basado únicamente en aspectos histopatológicos. Avances recientes en el conocimiento de su biología molecular han llevado a una nueva clasificación histomolecular más precisa, con importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas. Al margen de estos avances, la identificación de biomarcadores circulantes que faciliten el diagnóstico y la evaluación de la respuesta al tratamiento constituye un reto y un área de investigación emergente en neurooncología. En este artículo se describen las principales características moleculares de los gliomas difusos y el potencial papel como biomarcadores de las células tumorales, los ácidos nucleicos, las vesículas extracelulares y las proteínas circulantes en sangre periférica.

Palabras clave: Glioma difuso. Glioblastoma. Biomarcadores. Sangre periférica. Vesículas extracelulares.

Abstract

Diffuse gliomas account for the vast majority of all malignant primary brain tumors. They constitute a heterogeneous group of tumors with varying aggressive course and prognosis. Traditionally, their classification has been based on histopathologic features. Recent progress in molecular profiling of these tumors has led to a more precise diagnostic classification incorporating molecular characteristics, also with important implications in both prognosis and therapeutic approaches. Besides these advances, the identification of circulating biomarkers assisting in diagnosis and response to treatment monitoring is an unmet need and constitutes an emerging field of research in neuro-oncology. This review focuses on the most relevant molecular features of diffuse gliomas, and the potential impact of novel candidate blood-based markers such as circulating tumor cells, cell-free tumor nucleic acids, and extracellular vesicles and proteins.

(Kranion. 2019;14:100-6)

Corresponding author: Jaime Gállego Pérez-Larraya, jgallego@unav.es

Key words: Diffuse glioma. Glioblastoma. Biomarkers. Peripheral blood. Extracellular vesicles.

INTRODUCCIÓN

Los gliomas difusos son los tumores cerebrales primarios malignos más frecuentes en el adulto, comprendiendo hasta un 80% de todos ellos. Se trata de un grupo de tumores muy heterogéneo, con

grados de agresividad y pronóstico muy diversos. Aunque su tratamiento sigue basándose en la combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia, en las últimas décadas se han producido importantes avances y mejoras significativas en las cifras de supervivencia. Además, el mejor conocimiento de

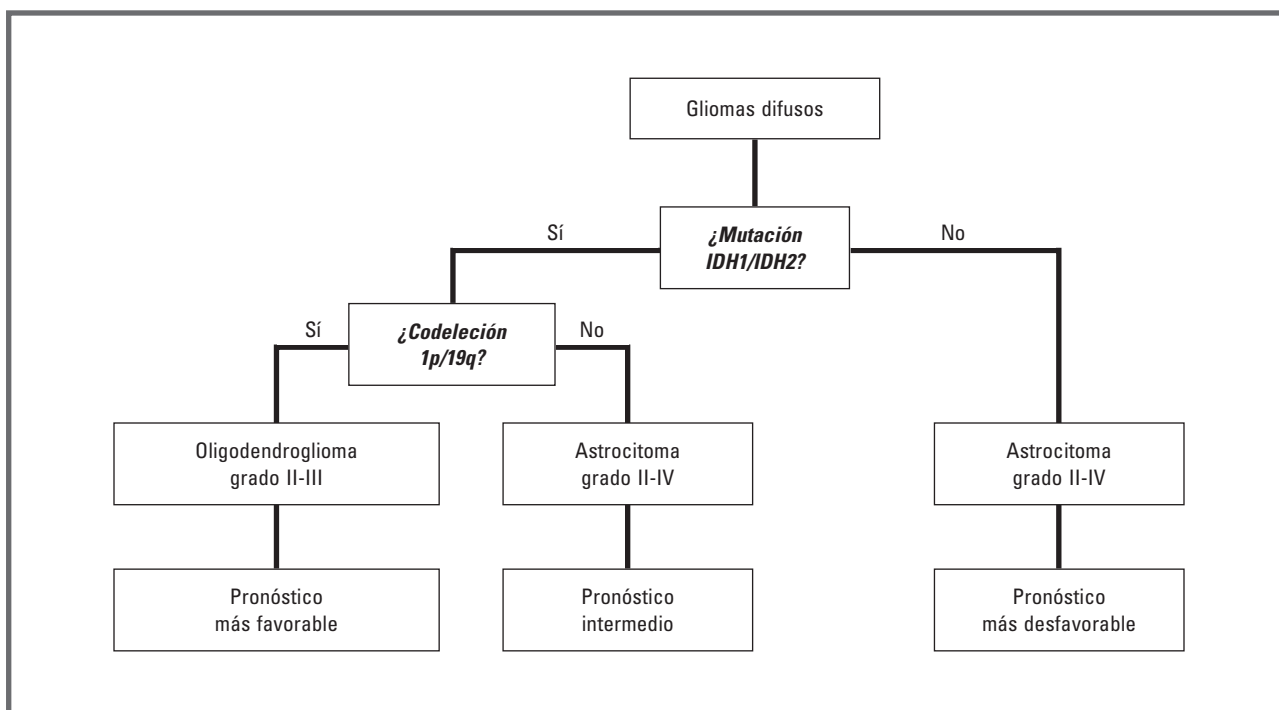


FIGURA 1. Resumen esquemático de la nueva clasificación histomolecular de los gliomas y sus implicaciones pronósticas.

su biología molecular ha permitido identificar a pacientes con mejor pronóstico y con mayor probabilidad de responder a tratamientos específicos¹.

DIAGNÓSTICO HISTOMOLECULAR

Durante las últimas cuatro décadas, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los tumores del sistema nervioso central se ha fundamentado únicamente en aspectos histológicos. Así, los gliomas podían clasificarse en astrocitomas, oligodendrogliomas o gliomas mixtos en función de las características fenotípicas de las células tumorales y su similitud con células de estirpe astrocitario u oligodendroglial. De igual manera, la gradación de cada tumor se establecía con base en aspectos histopatológicos como la densidad celular, atipia nuclear y actividad mitótica, necrosis y proliferación microvascular. Esta clasificación, basada en aspectos meramente histológicos, tiene importantes limitaciones, como, por una parte, la gran variabilidad interobservador (con discordancia de hasta un 20-70%) y, por otra, las notables diferencias en las cifras de supervivencia de pacientes con tumores con idénticas características histopatológicas.

La eclosión de la era molecular durante la última década ha facilitado un mejor entendimiento de las bases genéticas de la génesis tumoral de los gliomas, y ha propiciado la identificación de marcadores moleculares diagnósticos y pronósticos

relevantes. La integración de los aspectos histológicos y moleculares ha supuesto el principal hito en la última clasificación de la OMS, traducéndose a su vez en importantes implicaciones para la práctica clínica². Entre los diferentes marcadores moleculares incorporados, los más relevantes son la mutación de los genes *IDH1* e *IDH2* y la codeleción 1p19q (Fig. 1).

IDH1 e IDH2

Los genes *IDH1* e *IDH2* codifican dos importantes enzimas para el metabolismo celular: la isocitrato deshidrogenasa 1, presente en peroxisomas y citosol, y la isocitrato deshidrogenasa 2, presente en la mitocondria. Estas proteínas catalizan la carboxilación oxidativa de isocitrato a alfa-cetoglutarato, que resulta en la producción de NADPH en el ciclo de Krebs. Las mutaciones de estos genes promueven reacciones que generan el oncometabolito 2-hidroxiglutarato, que a su vez causa modificaciones epigenéticas en las células afectadas. La mutación *IDH1*^{R132H} es la más frecuente de todas (85%) y es fácilmente detectable mediante inmunohistoquímica. Actualmente, su análisis forma parte del estudio anatomopatológico estándar de los gliomas. En caso de resultar negativo y en un contexto clínico apropiado, se recomienda realizar secuenciación de los genes *IDH1* e *IDH2* para analizar las otras mutaciones menos frecuentes³.

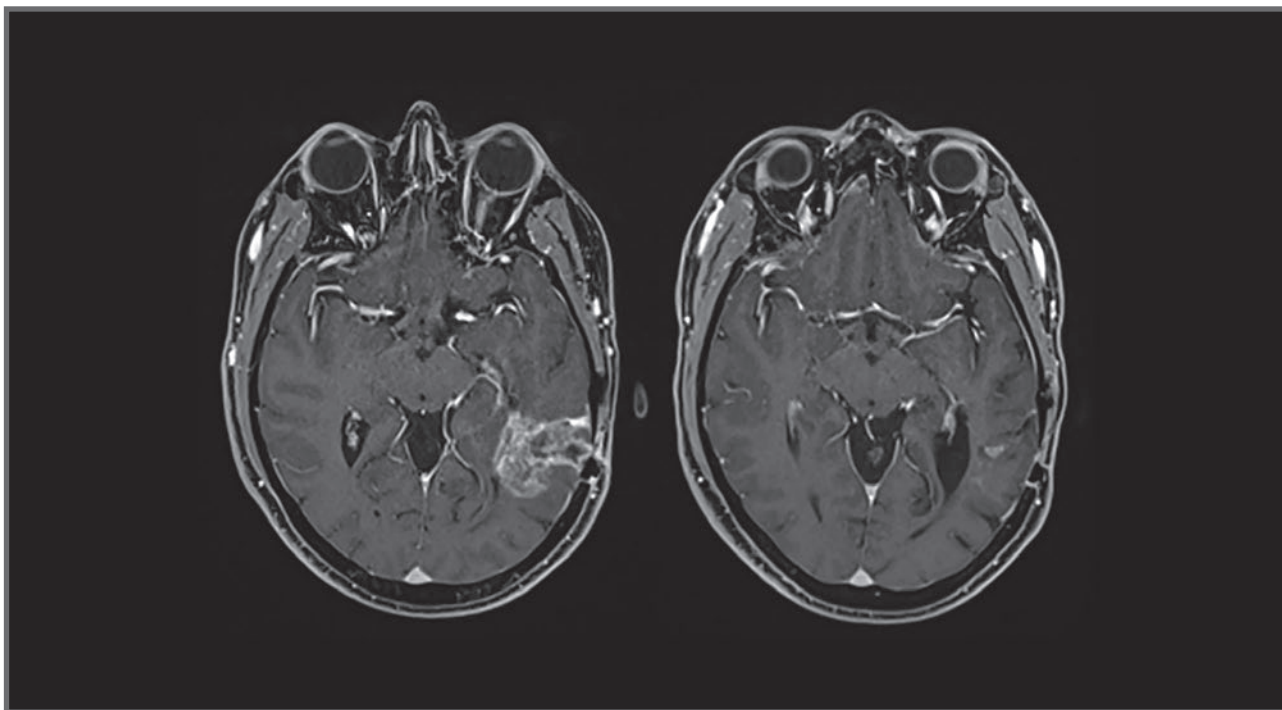


FIGURA 2. Respuesta parcial tras 4 ciclos de temozolomida con dosis densas (150 mg/m²/día, durante 7 días consecutivos, cada 14 días) en un paciente varón de 57 años con un glioblastoma recurrente con metilación del promotor de *MGMT*.

Este marcador molecular tiene una utilidad doble: diagnóstica y pronóstica. Aunque presente en solo el 5% de los glioblastomas (GBM) primarios, es una mutación muy frecuente en los secundarios (73-85%) y en los astrocitomas y oligodendrogliomas grados II y III (72-100%). Además, está ausente en los gliomas grado I y en los demás tumores cerebrales, por lo que su detección confirma el diagnóstico de glioma difuso^{3,4}.

Además, los pacientes con gliomas difusos asociados a la mutación de los genes *IDH1* o *IDH2* tienen un pronóstico más favorable que aquellos con tumores de igual grado, pero sin la mutación, como lo reflejan las medianas de supervivencia global de 31 meses frente a 15 meses en pacientes con GBM con y sin mutación, respectivamente, o de 62 meses frente a 20 meses en pacientes con astrocitomas anaplásicos con y sin mutación, respectivamente. Lo mismo sucede en los gliomas de bajo grado o grado II. De hecho, los astrocitomas grado II o III sin mutación de los genes *IDH1/IDH2* tienen un perfil molecular muy similar al de los GBM primarios⁵.

Codeleción 1p19q

La codeleción o pérdida completa del brazo corto del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 19, detectable mediante técnicas de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) o PCR (*polymerase chain*

reaction), es un marcador genético definitorio o diagnóstico de oligodendroglioma. Su detección en un glioma de características histológicas ambiguas, como los hasta hace poco catalogados de gliomas mixtos, permite confirmar el diagnóstico de oligodendroglioma^{2,6}. Además de su valor diagnóstico, constituye también un importante factor pronóstico favorable y un predictor de respuesta al tratamiento con agentes alquilantes y radioterapia⁷.

Metilación del gen *MGMT*

Otro marcador molecular relevante en los gliomas de alto grado es la metilación del promotor del gen *MGMT*. Aunque carece de valor diagnóstico y por tanto no se ha incorporado como tal en la última clasificación de la OMS, constituye un marcador de gran utilidad en la práctica clínica. El gen *MGMT* codifica la enzima reparadora del ADN O6-metilguanina ADN metiltransferasa. La metilación del promotor conlleva el silenciamiento de su transcripción y, por tanto, la pérdida de expresión de esta proteína reparadora, lo que se traduce en una mayor sensibilidad de la célula tumoral al efecto de fármacos alquilantes⁸. Los pacientes con GBM con metilación del promotor del gen *MGMT*, presente en aproximadamente el 45% de los casos, responden mejor a temozolomida (Fig. 2) y tienen un mejor pronóstico que aquellos sin la metilación. Al igual que la mutación de *IDH1/IDH2*, se trata de uno de

los factores pronósticos independientes más relevantes en pacientes con GBM y es predictor de respuesta al tratamiento estándar con temozolomida^{9,10}.

H3F3A

Finalmente, debe destacarse también la incorporación de las mutaciones del gen *H3F3A* como marcador diagnóstico de gliomas de tronco o de línea media, característicos aunque no exclusivos de la infancia. La mutación más frecuente es la H3K27M, que además se asocia a un peor pronóstico tanto en niños como en adultos¹¹.

BIOMARCADORES CIRCULANTES

En la actualidad no existen biomarcadores sanguíneos validados para gliomas difusos, lo que dificulta no solo el manejo de los pacientes que los padecen, sino también los avances en su tratamiento. Por tanto, la búsqueda de marcadores diagnósticos, pronósticos y de seguimiento se ha convertido en un importante objeto de investigación por la repercusión que podría tener en la práctica clínica diaria¹².

El hallazgo de un marcador diagnóstico específico en un medio tan accesible como la sangre sería de enorme trascendencia y utilidad, especialmente para aquellos pacientes que no pueden someterse a una intervención quirúrgica, bien por el deterioro de su estado general, bien por la localización del tumor en áreas de difícil acceso o elocuentes. Su empleo se extendería también a la batería de exploraciones complementarias a realizar en cualquier paciente con una lesión cerebral de naturaleza incierta descubierta por neuroimagen. En este contexto, la ausencia de este marcador diagnóstico permitiría idealmente excluir el diagnóstico de un glioma.

Por otra parte, un marcador del estado de la enfermedad facilitaría mucho el manejo y seguimiento de los pacientes con estas enfermedades, ya que la monitorización de la respuesta al tratamiento mediante resonancia magnética (RM) cerebral es muy imprecisa y no está exenta de problemas, como las interpretaciones ambiguas o las formas de pseudorespuesta y pseudoprogresión, relacionadas con modalidades terapéuticas como la radioterapia y otras más recientes como los antiangiogénicos y la inmunoterapia¹³. A ello habría que añadir la mayor comodidad para el paciente y el menor coste en relación con los estudios repetidos de RM.

Células tumorales circulantes

Las células tumorales circulantes (CTC) son células liberadas directamente por el propio tumor al

torrente sanguíneo. Estas células, específicas del tumor, constituyen el principio fundamental para el desarrollo de las metástasis. Desde hace años existe evidencia indirecta de la presencia de CTC en pacientes con gliomas, particularmente GBM. Aunque muy infrecuentes, se han descrito metástasis extracraneales de GBM hasta en un 0,5% de los pacientes¹⁴. Además, también se han dado casos de transmisión de GBM en pacientes receptores de un trasplante de órgano sólido procedente de un donante con esta enfermedad¹⁵.

Se están desarrollando diversas técnicas para detectar y caracterizar las CTC, incluyendo sistemas basados en citometría de flujo, separación inmunomagnética y microscopía automatizada. La única técnica empleada en la práctica clínica para la detección de estas células en tumores sólidos sistémicos se basa fundamentalmente en la detección de moléculas de adhesión de células epiteliales y citoquinas, y resulta ineficaz en gliomas porque sus células no expresan tales biomarcadores epiteliales.

Recientemente, se ha descrito la detección de CTC en sangre periférica de pacientes con GBM, con una sensibilidad de entre el 20 y el 70%. El número de células parece relacionarse con el estado de la enfermedad, siendo mayor en los casos en que la enfermedad se encuentra en progresión. Asimismo, su concentración parece reducirse después de tratamiento con radioterapia, lo que sugiere de nuevo su asociación con el volumen tumoral y el estado de la enfermedad¹⁶⁻¹⁸.

Los retos actuales de esta línea de investigación pasan por mejorar la metodología diagnóstica, incrementando su sensibilidad, y por demostrar su utilidad clínica en la práctica diaria. Asimismo, es necesario aclarar si las CTC son representativas del conjunto del tumor y si son capaces de reflejar las características moleculares dinámicas de este.

Ácidos nucleicos circulantes

En la sangre circulan normalmente fragmentos libres de ADN resultantes de procesos de inflamación o apoptosis celular. En pacientes con cáncer hay además fragmentos más pequeños de ADN tumoral circulante que puede contener alteraciones genéticas somáticas específicas de cada tumor, incluyendo mutaciones, deleciones y traslocaciones. Aunque su concentración sea muy reducida, especialmente en pacientes con tumores cerebrales por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), existen técnicas de secuenciación de nueva generación y PCR digital que permiten detectar estas alteraciones en el ADN tumoral circulante de pacientes con diferentes gliomas¹⁹. En un estudio reciente, detectamos ADN tumoral en el plasma de pacientes con gliomas grado II, III y IV,

y encontramos una correlación directa con el grado y el volumen del componente tumoral captante de contraste en RM. Un hallazgo relevante de ese trabajo fue la detección de la mutación IDH1^{R132H}, con una sensibilidad del 60% y una especificidad del 100%. La sensibilidad de la prueba se incrementaba conforme lo hacía el volumen del área de realce de contraste, lo que refleja la relación entre la concentración plasmática de ADN tumoral circulante y la rotura de la BHE²⁰. Dado que esta mutación es específica de los gliomas, su identificación en sangre periférica en un paciente con una lesión de aspecto tumoral permite confirmar el origen glial de la neoplasia.

Otros autores han detectado en sangre periférica otras alteraciones moleculares y epigenéticas, como codeleción 1p19q, mutación de EGFRvIII y estado de metilación del promotor de los genes *MGMT*, *PTEN* y *CDKN2A*, con sensibilidades entre el 20 y el 80%, y especificidades por encima del 90%^{12,19}.

Otros tipos de biomarcadores circulantes son los microARN (miARN). Se trata de pequeños fragmentos de ARN no codificante que actúan regulando el estado epigenético y la expresión génica de las células y el microambiente tumorales. Diversos grupos han estudiado el patrón de expresión de diferentes miARN en sangre periférica de pacientes con GBM, señalando su capacidad para diferenciar pacientes de sujetos sanos, y en algunos casos también como potenciales marcadores pronósticos y de seguimiento de la enfermedad como los mir-21, mir-128 y mir-342-3p^{12,19}.

Al igual que sucede con el ADN circulante tumoral, los miARN circulantes con potencial diagnóstico y pronóstico deben ser validados en estudios prospectivos con adecuado tamaño muestral antes de que puedan ser incorporados a la práctica clínica.

Vesículas extracelulares

La búsqueda de marcadores de cáncer en reservorios biológicos como las vesículas extracelulares se ha convertido en la actualidad en una estrategia emergente muy prometedora. Son vesículas de membrana que las células liberan al medio extracelular en condiciones normales. Se conocen varios tipos de vesículas según el mecanismo de formación y contenido, siendo las más estudiadas los exosomas y las microvesículas. Los exosomas se forman por invaginaciones de membranas endosomales que dan lugar a vesículas dentro del propio endosoma, y que posteriormente se fusionan con la membrana plasmática liberándose al exterior por exocitosis. Tienen un diámetro de 30-100 nm y una forma homogénea. Las microvesículas se forman

directamente a partir de evaginaciones de la propia membrana plasmática, tienen un diámetro mayor de 100 nm, y adquieren formas muy variables²¹. Se trata de vesículas biológicamente muy activas que median en la comunicación intercelular, con el potencial de transferir moléculas específicas a células homólogas y heterólogas adyacentes o distantes y modular su función²².

En las células tumorales se ha observado un incremento de los procesos de exocitosis y secreción de microvesículas en comparación con células no tumorales, y en pacientes con cáncer hay una mayor concentración de exosomas circulantes en sangre periférica que en sujetos sanos²². Estas vesículas contienen ácidos nucleicos (ADN, ARN, miARN), proteínas y lípidos sintetizados en las células tumorales, y son capaces de inducir cambios en las células receptoras relacionados con la proliferación e invasividad tumoral, angiogénesis, metástasis y evasión del control inmunitario²³.

Se ha descrito liberación de vesículas extracelulares, especialmente exosomas, por parte de las células tumorales gliales, señalando a este tipo de partículas circulantes como reservorios de potenciales biomarcadores^{24,25}. En concreto, se ha descrito la detección de la mutación EGFRvIII en exosomas aislados del suero de pacientes con GBM, con una sensibilidad del 82% y una especificidad del 79%²⁶.

Por otra parte, partiendo de estudios previos que han demostrado una expresión diferencial de miARN entre tejidos tumorales y sanos, incluyendo GBM, se ha analizado la expresión diferencial de numerosos miARN en vesículas extracelulares circulantes en sangre de pacientes con gliomas²⁷. En esta línea, nuestro grupo estudió la expresión de un panel de miARN en exosomas circulantes en pacientes con GBM y sujetos sanos. Comprobamos que la expresión de los miARN miR-320 y miR-574-3p, y especialmente el ARN pequeño no codificante RNU6-1, era significativamente mayor en el grupo de pacientes y permitía distinguir pacientes con GBM de controles sanos²². Siguiendo esta línea de investigación, y con el fin de estudiar la especificidad diagnóstica de RNU6-1, recientemente hemos analizado su expresión en exosomas circulantes de pacientes con GBM, controles sanos, y pacientes con diferentes lesiones parenquimatosas cerebrales que pueden compartir características radiológicas con el GBM, como ictus isquémico en fase subaguda, hemorragia en fase aguda/subaguda, lesiones desmielinizantes en fase aguda, y otros tumores cerebrales como metástasis y linfoma cerebral primario. Además de confirmar nuestro hallazgo previo de una mayor expresión de RNU6-1 en pacientes con GBM frente a controles sanos, los datos obtenidos sugieren que el RNU6-1 aislado de exosomas circulantes en sangre periférica podría servir como

marcador diferencial de GBM frente a linfoma cerebral primario y lesiones cerebrales no tumorales (Puigdelloses M, pendiente de publicación).

Proteínas circulantes no específicas de tumor

Las proteínas circulantes sanguíneas se han utilizado históricamente como biomarcadores tumorales en diferentes tipos de tumores. Los ejemplos más ilustrativos son: PSA en cáncer de próstata, CEA en cáncer colorrectal, CA19-9 en cáncer de páncreas y CA125 en cáncer de ovario.

Partiendo de datos de expresión génica y proteica, se ha investigado el papel como biomarcador diagnóstico, pronóstico y de seguimiento de una amplia variedad de proteínas circulantes, incluyendo marcadores neuronales o gliales, citocinas inmunomoduladoras y proteínas pro-angiogénicas^{12,28}. Entre las más relevantes se encuentran IGFBP-2, YKL-40 y GFAP. Los niveles plasmáticos de estas proteínas se han encontrado repetidamente elevados en pacientes con GBM en comparación con sujetos sanos y pacientes con otros tumores cerebrales no gliales, y también se ha sugerido su correlación con las cifras de supervivencia en pacientes con GBM²⁹.

En un estudio reciente, analizamos conjuntamente los niveles plasmáticos de estas tres proteínas en una serie de pacientes con GBM, pacientes con otros tumores cerebrales no gliales y controles sanos, confirmando su potencial utilidad como marcadores diagnósticos y pronósticos. Asimismo, propusimos un algoritmo diagnóstico para pacientes con lesiones cerebrales compatibles con GBM en estudios de neuroimagen: valores de GFAP $\geq 0,2$ ng/ml serían sugestivos de GBM en ausencia de antecedentes recientes de traumatismo craneoencefálico o de enfermedad cerebrovascular; en pacientes con niveles de GFAP por debajo de ese límite, valores plasmáticos de YKL-40 > 60 ng/ml permitirían distinguir el GBM de otros tumores cerebrales no gliales con una sensibilidad del 65% y una especificidad del 78%²⁹.

A diferencia de las CTC y los ácidos nucleicos circulantes, la principal limitación del empleo de proteínas circulantes como biomarcadores sanguíneos de gliomas es su falta de especificidad. De hecho, los niveles circulantes de estas proteínas se asocian también a diversas lesiones parenquimatosas cerebrales, lo que sugiere que su liberación al torrente sanguíneo está favorecida fundamentalmente por la disrupción de la BHE y los procesos inflamatorios asociados, sea cual sea la etiología. Los estudios proteómicos pueden ser de gran utilidad para identificar proteínas circulantes que se secreten en baja cantidad por las células tumorales

gliales, y que constituyan, por tanto, marcadores tumorales más específicos de enfermedad tumoral cerebral¹².

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Se ha sugerido que el líquido cefalorraquídeo es el medio más adecuado para la búsqueda de biomarcadores de gliomas, ya que al encontrarse dentro de la BHE, la concentración de tales marcadores es seguramente mayor en este medio que en la sangre. Así lo sugieren estudios que han identificado ADN tumoral libre y mutaciones de *IDH1* y *EGFRvIII* en exosomas circulantes en líquido cefalorraquídeo, con mejor sensibilidad y especificidad que en sangre³⁰⁻³². Sin embargo, esta estrategia resulta poco práctica por su invasividad y porque la realización de una punción lumbar está a menudo contraindicada en pacientes con tumores cerebrales con efecto de masa.

CONCLUSIONES

La búsqueda de biomarcadores circulantes es una línea de investigación emergente en neurooncología. La identificación en sangre periférica de marcadores diagnósticos, pronósticos y de evaluación de la respuesta al tratamiento en pacientes con gliomas difusos facilitaría su manejo diagnóstico y terapéutico. La detección de CTC y de ácidos nucleicos circulantes, tanto libres como en microvesículas extracelulares, constituye una de las estrategias más prometedoras, aunque es preciso todavía incrementar la sensibilidad de las diferentes técnicas y validar sus resultados en estudios prospectivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Esparragosa I, Díez-Valle R, Tejada S, Gállego Pérez-Larraya J. Management of diffuse glioma. *Presse Med.* 2018;47:e199-e212.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavence WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, et al. WHO Classification and grading of tumors of the central nervous system. Lyon: International Agency for Research on Cancer Press; 2016.
3. Horbinski C. What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathol.* 2013;125:621-36.
4. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;19:360:765-73.
5. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idhah A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.* 2009;27:4150-4.
6. 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;14:842-53.
7. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, Kros JM, Kouwenhoven MC, 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;31:344-50.
8. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000;343:1350-4.
9. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:997-1003.

10. Gállego Pérez-Larraya J, Ducray F, Chinot O, Catry-Thomas I, Taillandier L, Guillamo JS, et al. Temozolomide in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma and poor performance status: an ANOCEF phase II trial. *J Clin Oncol*. 2011;29:3050-5.
11. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfors J, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome Project. *Nat Genet*. 2012;44:251-3.
12. Touat M, Duran-Peña A, Alentorn A, Lacroix L, Massard C, Idbaih A. Emerging circulating biomarkers in glioblastoma: promises and challenges. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15:1311-23.
13. Gállego Pérez-Larraya J, Lahutte M, Petrirena G, Reyes-Botero G, González-Aguilar A, Houillier C, et al. Response assessment in recurrent glioblastoma treated with irinotecan-bevacizumab: comparative analysis of the Macdonald, RECIST, RANO, and RECIST + F criteria. *Neuro Oncol*. 2012;14:667-73.
14. Beauchesne P. Extra-neural metastases of malignant gliomas: myth or reality? *Cancers (Basel)*. 2011;3:461-77.
15. Armanios MY, Grossman SA, Yang SC, White B, Perry A, Burger PC, et al. Transmission of glioblastoma multiforme following bilateral lung transplantation from an affected donor: case study and review of the literature. *Neuro Oncol*. 2004;6:259-63.
16. Macarthur KM, Kao GD, Chandrasekaran S, Alonso-Basanta M, Chapman C, Lustig RA, et al. Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Res*. 2014;74:2152-9.
17. Müller C, Holtschmidt J, Auer M, Heitzer E, Lamszus K, Schulte A, et al. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Sci Transl Med*. 2014;6:247.
18. Sullivan JP, Nahed BV, Madden MW, Oliveira SM, Springer S, Bhere D, et al. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discov*. 2014;4:1299-309.
19. Zachariah MA, Oliveira-Costa JP, Carter BS, Stott SL, Nahed BV. Blood-based biomarkers for the diagnosis and monitoring of gliomas. *Neuro Oncol*. 2018;20:1155-61.
20. Boisselier B, Gállego Pérez-Larraya J, Rossetto M, Labussière M, Ciccarino P, Marie Y, et al. Detection of IDH1 mutation in the plasma of patients with glioma. *Neurology*. 2012;79:1693-8.
21. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200:373-83.
22. Manterola L, Guruceaga E, Gállego Pérez-Larraya J, González-Huarriz M, Jauregui P, Tejada S, et al. A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro Oncol*. 2014;16:520-7.
23. Antonyak MA, Cerione RA. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer. *Methods Mol Biol*. 2014;1165:147-73.
24. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008;10:1470-6.
25. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2008;10:619-24.
26. Manda SV, Kataria Y, Tatireddy BR, Ramakrishnan B, Ratnam BG, Lath R, et al. Exosomes as a biomarker platform for detecting epidermal growth factor receptor-positive high-grade gliomas. *J Neurosurg*. 2018;128:1091-101.
27. Hermansen SK, Kristensen BW. MicroRNA biomarkers in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2013;114:13-23.
28. Holdhoff M, Yovino SG, Boadu O, Grossman SA. Blood-based biomarkers for malignant gliomas. *J Neurooncol*. 2013;113:345-52.
29. Gállego Pérez-Larraya J, Paris S, Idbaih A, Dehais C, Laigle-Donadey F, Navarro S, et al. Diagnostic and prognostic value of preoperative combined GFAP, IGFBP-2, and YKL-40 plasma levels in patients with glioblastoma. *Cancer*. 2014;120:3972-80.
30. Chen WW, Balaj L, Liao LM, Samuels ML, Kotsopoulos SK, Maguire CA, et al. BEAMing and droplet digital PCR analysis of mutant IDH1 mRNA in glioma patient serum and cerebrospinal fluid extracellular vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013;2:e109.
31. Figueroa JM, Skog J, Akers J, Li H, Komotar R, Jensen R, et al. Detection of wild-type EGFR amplification and EGFRvIII mutation in CSF-derived extracellular vesicles of glioblastoma patients. *Neuro Oncol*. 2017;19:1494-502.
32. Wang Y, Springer S, Zhang M, McMahon KW, Kinde I, Dobbyn L, et al. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112:9704-9.