

Patología molecular

Patología molecular de los gliomas

M.A. Idoate

Departamento de Anatomía Patológica. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

INTRODUCCIÓN

Los gliomas son los tumores primarios más frecuentes del sistema nervioso central (SNC) y se manifiestan preferentemente en la población adulta. La incidencia poblacional general estimada es de aproximadamente 7 casos por cada 100.000 habitantes (1), lo que supone un problema médico relevante. Los gliomas son tumores que surgen de células gliales y comprenden los astrocitomas, los oligodendrogliomas y losependimomas.

PATOLOGÍA MOLECULAR DE LOS ASTROCITOMAS

Los astrocitomas representan en torno al 85% de los tumores primarios del SNC del adulto (1). De los gliomas es el tipo tumoral del que se conoce mejor

las alteraciones genéticas. Los astrocitomas pueden aparecer de forma esporádica, que es lo más frecuente, o con un carácter familiar en el contexto de síndromes clínicos bien definidos (Tabla 1).

Existen unas variantes clinicopatológicas especiales de astrocitomas que se conocen como astrocitoma pilocítico, xantastrocitoma pleomorfo, astrocitoma de células gigantes subependimario, oligoastrocitoma y oligoastrocitoma anaplásico, cuya oncogénesis no será desarrollada en el presente trabajo.

Para entender la biología molecular de los astrocitomas primero debemos considerar la gradación histopatológica de estos tumores, que tiene una interesante correlación pronóstica (Tabla 2).

Sería simplista pensar que las alteraciones moleculares que dan lugar al desarrollo y eventual malignización de los astrocitomas se producen de acuerdo con una secuencia establecida de una manera

Tabla 1. Síndromes clínicos en los que se desarrollan tumores astrocitarios de carácter familiar.

Síndrome de la poliposis adenomatosa familiar colorrectal (Síndrome de Turcot)
Síndrome de Li-Fraumeni
Síndrome del carcinoma de células basales de tipo nevoide (Síndrome de Gorlin-Goltz)
Neurofibromatosis tipos I y II

Tabla 2. Gradación histológica de los astrocitomas (clasificación de la OMS).

Grado	Denominación	Características generales
1	Ganglioglioma. Astrocitoma pilocítico.	Benigno. Bien delimitado. Niños y jóvenes.
2	Astrocitoma (de bajo grado). Oligodendroglioma (de bajo grado). Ependimoma (de bajo grado).	Relativamente benigno. Infiltrante. Recidivante. Niños y jóvenes.
3	Astrocitoma anaplásico o astrocitoma de alto grado. Oligodendroglioma anaplásico. Ependimoma anaplásico.	Maligno. Infiltrante. Rápidamente recidivante. Adultos.
4	Glioblastoma multiforme o astrocitoma de alto grado. Glioblastoma multiforme <i>de novo</i> . Glioblastoma multiforme secundario.	Maligno. Infiltrante. Rápidamente recidivante. Potencialmente metastatizante. Adultos.

general para todos los astrocitomas. Por supuesto, existen unos genes que están habitualmente implicados en la oncogénesis, que aparecen mutados, deletionados, amplificados o sobreexpresados, y cuyos productos génicos interactúan entre sí. También se puede afirmar que determinadas inactivaciones génicas se producen asociadas o, por el contrario, con tendencia a excluirse mutuamente. Estos hechos son generales y no tienen por qué reproducirse exactamente en un caso particular. La investigación molecular de los gliomas, especialmente la de los astrocitomas, nos ha mostrado que existen unas alteraciones genéticas que podríamos considerar especialmente relevantes, frente a otras que parecen tener una menor incidencia. En la investigación molecular de los gliomas se ha hecho especial énfasis en el estudio de la alteración génica, pero no en el conocimiento del estado funcional de las correspondientes proteínas. En el futuro es de prever que se descubran nuevas alteraciones genéticas que pueden cobrar una especial relevancia en la malignización astrocitaria, al mismo tiempo que un mayor conocimiento de las alteraciones postranscripcionales y de regulación de las proteínas oncosupresoras y oncogénicas.

Los gliomas, y en especial los astrocitomas, constituyen un modelo muy adecuado para los estudios de biología molecular ya que se conocen los estadios morfológicos de progresión tumoral. Las alteraciones moleculares que explican aspectos tan diversos del astrocitoma como los mecanismos de malignización, la proliferación celular, la invasividad tisular, la angiogénesis y la apoptosis se analizan de forma

separada con un fin didáctico, aunque como es lógico estos aspectos de la neoplasia se encuentran interrelacionados.

ALTERACIONES MOLECULARES DE LOS ASTROCITOMAS DE BAJO GRADO

Los astrocitomas de bajo grado afectan especialmente a pacientes de la tercera y cuarta décadas (edad media 34 años), con una ligera mayor predilección por los varones. Sólo un 10% se presentan en pacientes de menos de 20 años.

Los astrocitomas de bajo grado proceden de un precursor todavía no bien identificado, probablemente de un astrocito maduro. Se caracterizan histopatológicamente (Fig. 1) por una celularidad en general monomorfa, sin atipia, moderada densidad celular, ausencia de figuras mitóticas y capacidad infiltrativa no destructiva del tejido en el que surge. Tienen una actividad proliferativa ligera, menor del 5% en términos inmunohistoquímicos, con una media que no supera el 2,5% (3), lo que justifica su lento crecimiento. Sin embargo, la capacidad infiltrativa del tumor es alta. Éste se acompaña de una red vascular relativamente escasa, sobre todo si la comparamos con su contrapartida maligna. Nunca se desarrolla necrosis espontánea. No se aprecia apoptosis. Existen diferentes variantes histológicas de astrocitomas de bajo grado—fibrilar, gemistocítico o protoplasmático— aunque el mecanismo oncogénico parece ser el mismo.

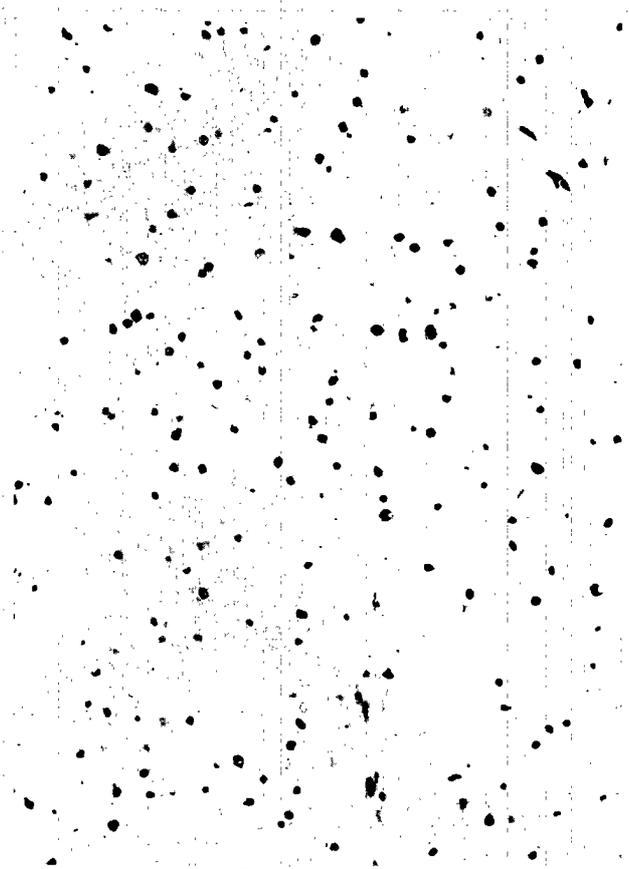


Figura 1. Proliferación astrocitaria de escasa densidad celular con predominio de la regularidad correspondiente a un astrocitoma fibrilar de bajo grado (original, HE $\times 200$).

Alteraciones moleculares implicadas en la génesis del astrocitoma: sobreexpresión de factores de crecimiento e inactivación de genes supresores

En los estudios del genoma del astrocitoma de bajo grado mediante hibridación genómica comparada (CGH) se aprecia que el número global de las deleciones y las amplificaciones es relativamente escaso, en especial si lo comparamos con el de los astrocitomas de alto grado (4).

No se conoce con seguridad cuáles son los eventos genéticos iniciales que actúan sobre la célula precursora del astrocitoma. Las alteraciones génicas detectadas en el astrocitoma son numerosas (Tabla 3), pero de entre ellas destacan por su frecuencia la mutación del gen TP53 (5), que frecuentemente se asocia a la pérdida del otro alelo, ubicado en el cro-

mosoma 17p (6), la sobreexpresión de los genes del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y de su receptor (PDGFR), y la pérdida del cromosoma 22q (7). Las dos primeras alteraciones génicas tienden a asociarse (8). Además, la pérdida del cromosoma 19q es la única alteración cromosómica relevante común al astrocitoma y al oligodendroglioma (7).

El gen TP53 puede desempeñar un papel clave en el desarrollo del astrocitoma solo o en combinación con otros factores como la sobreexpresión del PDGF o de su receptor (PDGFR). La inactivación de la proteína por mutación del gen TP53 se produce en torno al 30% a 50% de los astrocitomas de bajo grado. Los exones que se dañan son fundamentalmente los identificados como 5 a 8, en especial los codones 175, 248 y sobre todo el 273 (7).

Respecto a otros genes supresores cuyas proteínas interactúan entre sí, como son los genes CDKN2A/2B y RB, hay contradicción entre los autores sobre el grado de implicación en el desarrollo de los astrocitomas de bajo grado (9, 10). Por lo general estos genes o no están alterados o sus alteraciones tienen escasa incidencia (11-13).

Factores determinantes de la proliferación celular en el astrocitoma

La actividad proliferativa ligera de los astrocitomas de bajo grado puede atribuirse al efecto autocrino sobre la célula tumoral del PDGF y de su receptor (PDGFR alfa). El PDGF es un factor de crecimiento que se une a un receptor específico con actividad tirosincinasa. Éste último actúa sobre el núcleo, a través de los factores de transcripción y el complejo Ras-PAG. El mecanismo de activación génica implicado parece ser el de la sobreexpresión de los correspondientes genes (14).

Otros factores a considerar son la inactivación de un gen supresor no identificado en el cromosoma 22q, que está delecionado en la mayoría de los astrocitomas de bajo grado y, ocasionalmente, los efectos derivados de la alteración del gen supresor TP53 (7, 15).

Tabla 3. Alteraciones génicas y cromosómicas relevantes de los astrocitomas de bajo grado.

Región cromosómica	Genes	Proteínas	Mecanismo
4q11-12 5q33-35	Genes del PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas	Sobreexpresión (60%)
7p22 22q12.3-13.1	Genes del PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas	Sobreexpresión (60%)
9p21	CDKN2A/CDKN2B	p16/p15	Deleción hemizigótica hipermetilación del promotor, deleción homocigótica, pérdida del cromosoma 9p (21%)
11p	¿Gen supresor?	¿?	Deleción
10q25, 10p	MXI1? PAX-2?	¿?	Deleción
13q14	RB1	pRb	Mutación, deleción del cromosoma (28%)
17p	TP53	p53	Mutación del gen, deleción cromosómica (30% a 40%)
18q21	DCC	Molécula de adhesión	Deleción (7%)
19q13	¿Gen supresor?	¿?	Deleción
22q12.3-13.1	¿Gen supresor?	¿?	Deleción
22q13.3	¿Gen supresor?	¿?	Deleción

Invasividad tisular

La célula tumoral astrocitaria está dotada de cierta capacidad de migración (16). El potencial de invasión del astrocitoma de bajo grado se debe en general a una compleja relación entre la célula y la matriz extracelular. Los factores más estudiados han sido la molécula CD44, diferentes metaloproteinasas, inhibidores y activadores de las metaloproteinasas y diversos tipos de proteasas. La molécula CD44, que es un receptor glicoproteico de la membrana tumoral, establece contacto con varios componentes de la matriz extracelular. En los astrocitomas de bajo grado se aprecia escasa inmunorreactividad frente a este receptor (17), a diferencia de lo que ocurre en los astrocitomas de alto grado.

Apoptosis tumoral

La apoptosis en los astrocitomas no ha sido suficientemente estudiada. Mediante técnica de TUNEL se observa un índice apoptótico bajo (18). La inhibición de la apoptosis en los astrocitomas de bajo grado está mediada por la sobreexpresión del

gen BCL-2, la mutación del gen TP53 y la sobreexpresión del gen FAS (19). La expresión inmunohistoquímica de la proteína bcl-2 es especialmente intensa en los astrocitomas gemistocíticos, pero escasa en los astrocitomas de bajo grado (20).

Malignización de los astrocitomas de bajo grado

Los astrocitomas de bajo grado muestran en un 80% de los casos un comportamiento estable, aun en las recidivas (21); el resto experimentan una marcada tendencia hacia la malignización. Esta malignización puede progresar de una forma lenta (meses) o rápida (años) en función de las alteraciones génicas implicadas (4, 21). Aún no se conoce cuál es la combinación de genes determinantes de la velocidad de progresión de la malignización, aunque existe una serie de candidatos.

Un astrocitoma que se maligniza suele mostrar unos signos histopatológicos precoces como son el incremento de la actividad proliferativa y de la densidad celular. Éste, llamémosle astrocitoma de bajo grado en curso de malignización, muestra en los es-

tudios de CGH un mayor número de daños genómicos, deleciones o amplificaciones que el astrocitoma estable o de curso benigno (4, 22, 23).

Las alteraciones génicas que se supone están implicadas en la malignización y progresión tumoral son (21): la alteración de alguno de los genes interrelacionados CDKN2-CDK4,6/ciclina D1-RB, inactivación del gen delecionado en el cáncer colorrectal (DCC), alteración de los genes interrelacionados TP53-MDM2-CDKN1A (p21) (7) e inactivación del gen localizado en la región 22q13.3 (24). La mutación del gen TP53 puede asociarse a la del gen RB, aunque la cooperación de estos genes en la oncogénesis de los astrocitomas no se ha demostrado experimentalmente (25). La mutación del gen TP53 también puede asociarse a la deleción del gen CDKN2 (26) y cooperar ambos en la malignización.

Alteración de los genes interrelacionados CDKN2-CDK4,CDK6/ciclina D1-RB

Como es bien conocido, la actividad proliferativa celular está frenada por una serie de genes supresores que actúan conjuntamente ejerciendo un efecto de bloqueo del crecimiento (Fig. 2). De las alteraciones génicas mencionadas, investigaciones recientes

coinciden en apuntar a los genes interrelacionados CDKN2-CDK4,CDK6/ciclina D1-RB como claves en la malignización de los astrocitomas (27-30).

La alteración de este grupo de genes interrelacionados es tanto más frecuente cuanto mayor es el grado histológico del astrocitoma, de tal manera que la gran mayoría de los glioblastomas presentan alteración de uno u otro gen de esta secuencia (10, 28-30). Dos genes CDKN2A (p16) y CDKN2B (p15) se localizan en la región 9p21. Ambos genes experimentan similares mecanismos de inactivación. El producto génico del gen CDKN2A, la proteína p16, es un importante inhibidor de las cinasas dependiente de la ciclina (CDK4 y 6), y por tanto del complejo CDK-ciclina, lo que impide que la célula glial entre en la fase S. El efecto final de la proteína p16 es favorecer el estado activado de la pRb (forma hipofosforilada), lo que conlleva el bloqueo del factor E2F (factor de transcripción) inhibiendo la proliferación celular. Por el contrario, los complejos CDK-ciclina favorecen la inactivación (forma hiperfosforilada) de la pRb (Fig. 2) y la mitosis. La inactivación del gen CDKN2A es la alteración génica que más estrechamente se asocia a un aumento de la proliferación tumoral (27). La proteína p15, que ha sido menos estudiada, también ejerce una actividad similar de bloqueo del complejo CDK-ciclina D.

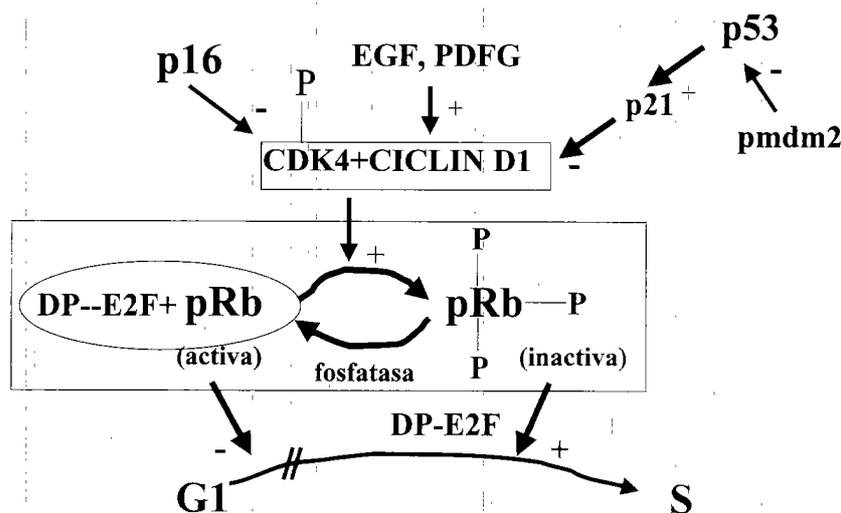


Figura 2. Esquema en el que se muestra la interrelación de diversas proteínas oncosupresoras, el complejo ciclina D-cinasas inhibidores de la ciclina y ciertos factores de crecimiento que tienen un efecto final sobre el estado funcional de la pRb.

Son varias las alteraciones génicas descritas en los astrocitomas de bajo grado (Tabla 3) que podrían ponerse en relación con el aumento de la capacidad de proliferación (7, 9, 13, 22, 27, 31, 32). Así, la delección o la hipermetilación del promotor del gen *CDKN2A/2B* (33, 34), la amplificación génica o la sobreexpresión de las cinasas dependientes de ciclina (*CDK4,CDK6*) o de la ciclina *D1* (35) y la sobreexpresión o amplificación del gen *MDM2* actuarían favoreciendo la hiperfosforilación de la proteína Rb. Por otro lado, la mutación o delección del gen *RB* tendrá también como efecto directo la ausencia de proteína Rb o la presencia de una proteína Rb mutada, también inactiva. Dos estudios (9, 24) coinciden en afirmar que la inactivación del gen *RB* puede tratarse de una alteración génica precoz e importante en la malignización de los astrocitomas. En concreto, se ha demostrado que la mutación del gen *RB* en los astrocitomas de bajo grado se produce especialmente en los codones 754, 519 y 905, todos ellos localizados cerca de los dominios funcionales del gen (30).

El gen TP53 en la malignización de los astrocitomas

La mutación del gen *TP53* es importante, pero no necesaria en la malignización de los astrocitomas (7), que favorece la expansión clonal de las células tumorales facilitando nuevos daños genómicos. Se postula que los astrocitomas de bajo grado que muestran mutación del gen *TP53* tienen una mayor proclividad hacia la malignización (36). Es posible que, más que el efecto directo de la inactivación del gen *TP53* sobre la malignización, sea el favorecimiento de la aparición de nuevas alteraciones génicas lo que determine en última instancia la malignización tumoral.

La proteína *p21^{WAF1}*, producto del gen *CDKN1*, es un inhibidor de las moléculas *CDK4* o *CDK6*, que son cinasas dependientes de la ciclina *D*. Mediante esta proteína la *p53* ejerce el efecto inhibitorio del complejo *CDK-ciclina*. Hasta el momento no se ha demostrado que el gen *P21* esté implicado en la malignización de los astrocitomas (37).

Implicación de la alteración del gen DCC en la malignización de los astrocitomas

El gen *DCC* (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) es un gen supresor que está localizado en el cromosoma 18 (18q21.1). Se trata de un gen de gran tamaño (1,35 megabases) y complejidad. Tiene dos efectos importantes: ejerce un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular como todo gen oncosupresor, y codifica una proteína transmembrana de 1447 aminoácidos, que actúa como una molécula de adhesión celular, de características estructurales comunes con otras moléculas de adhesión neural. La proteína correspondiente participa con otras proteínas en las acciones entre las células gliales y la matriz extracelular. Se ha observado experimentalmente que la pérdida de las moléculas de adhesión celular favorece el crecimiento infiltrativo tumoral (38).

El gen *DCC* transmite continuamente señales de carácter negativo sobre la proliferación celular, por lo que su pérdida favorece la mitosis. Inicialmente se describió que la ausencia de la proteína *dcc* constituía un factor esencial en la carcinogénesis colorectal, hasta el punto de que la delección del gen tiene valor pronóstico y permite seleccionar un grupo de pacientes cuyos tumores muestran mayor agresividad biológica.

Este gen está altamente expresado en las células gliales normales (39). En los astrocitomas los estudios sobre la inactivación del gen *DCC* son escasos y recientes y se han realizado en un número relativamente reducido de astrocitomas (40-42). Se postula que en la transformación de los astrocitomas de bajo a alto grado está implicada la delección del gen *DCC* (Fig. 3). Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la proteína del gen *DCC* se expresa en la mayoría de los astrocitomas de bajo grado (94%), pero sólo en el 53% de los de alto grado (42). La delección del gen *DCC* se produce en el 88% de los astrocitomas de alto grado (40) así como en las recidivas tumorales de los de bajo grado (42, 43). La alteración de este gen estaría ligada a la adquisición por el tumor de las propiedades de invasividad y neoangiogénesis.

Respecto a los mecanismos de inactivación del gen *DCC*, Ekstrand y cols. (44) han observado en

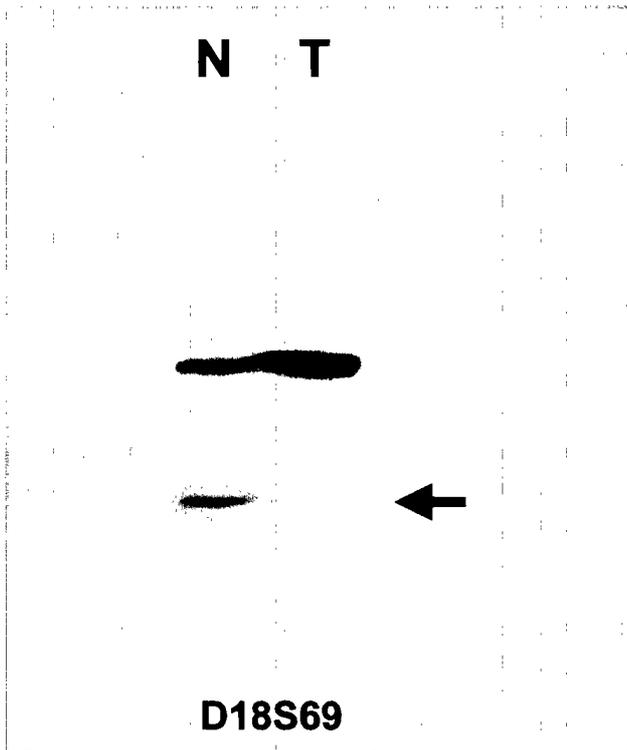


Figura 3. Pérdida de heterocigosidad en la región 18q (gen DCC) en un astrocitoma de bajo grado que experimentó una rápida malignización (Microsatélite D18S69; flecha alelo ausente en la muestra tumoral T comparada con la normal N).

estudios experimentales que el gen DCC se altera fundamentalmente por delección y secundariamente por mutación y formación de transcritos aberrantes.

ASTROCITOMAS DE ALTO GRADO: ASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS Y GLIOBLASTOMAS MULTIFORMES

Astrocitomas anaplásicos

El astrocitoma anaplásico es una proliferación astrocitaria atípica, con marcada densidad celular, intensa actividad proliferativa y presencia de figuras mitóticas. El tumor no experimenta necrosis espontánea. Con frecuencia se desarrollan focos de células tumorales pequeñas. Es interesante reseñar que este tipo tumoral puede acompañarse de un número aumentado de capilares respecto al astrocitoma de bajo grado, pero están revestidos por una única capa de endotelio. La aparición de necrosis y proliferación de vasos anómalos se correlaciona con la

progresión hacia el glioblastoma. La incidencia mayor del astrocitoma anaplásico se da en la cuarta y quinta décadas, edad intermedia entre la del astrocitoma de bajo grado y el glioblastoma.

Las alteraciones moleculares propias de la proliferación celular, apoptosis, angiogénesis e invasividad observadas en los astrocitomas anaplásicos son intermedias en tipo e incidencia entre las del glioblastoma multiforme y las de los astrocitomas de bajo grado, completando así la idea de continuidad biológica que enseña la histopatología convencional. En concreto, se ha demostrado delección del gen CDKN2 en un 27% de los astrocitomas anaplásicos, frente a un 55% en los glioblastomas (12). Además, el 66% de los astrocitomas anaplásicos mostraban alteraciones similares a las indicadas para los glioblastomas.

Glioblastoma multiforme

El glioblastoma multiforme es el tumor primario cerebral más frecuente del adulto. La incidencia mayor se da en la sexta y séptima décadas, con un ligero mayor predominio en los varones.

El glioblastoma multiforme es un tumor generalmente de origen astrocitario, pero en ocasiones puede ser de origen oligodendroglial y raramente ependimario. Es una neoplasia muy agresiva caracterizada por una marcada densidad celular, franca atipia citológica, intensa proliferación de vasos anómalos, necrosis con disposición en pseudoempalizada de las células tumorales, invasividad tumoral destructiva y habitual actividad mitótica (Fig. 4). Se observan frecuentes células tumorales apoptóticas. Es característico el intenso edema peritumoral, que se manifiesta radiológicamente. Existen diferentes variantes histopatológicas de glioblastoma, entre las que cabe destacar el gliosarcoma, el glioblastoma de células gigantes y el glioblastoma de células pequeñas, aunque el mecanismo de oncogénesis parece ser esencialmente el mismo.

La marcada densidad celular propia del glioblastoma se podría explicar como la consecuencia de un alto índice proliferativo, superior a la tasa de pérdida celular por necrosis y apoptosis. Estas células tumorales malignas activamente proliferantes

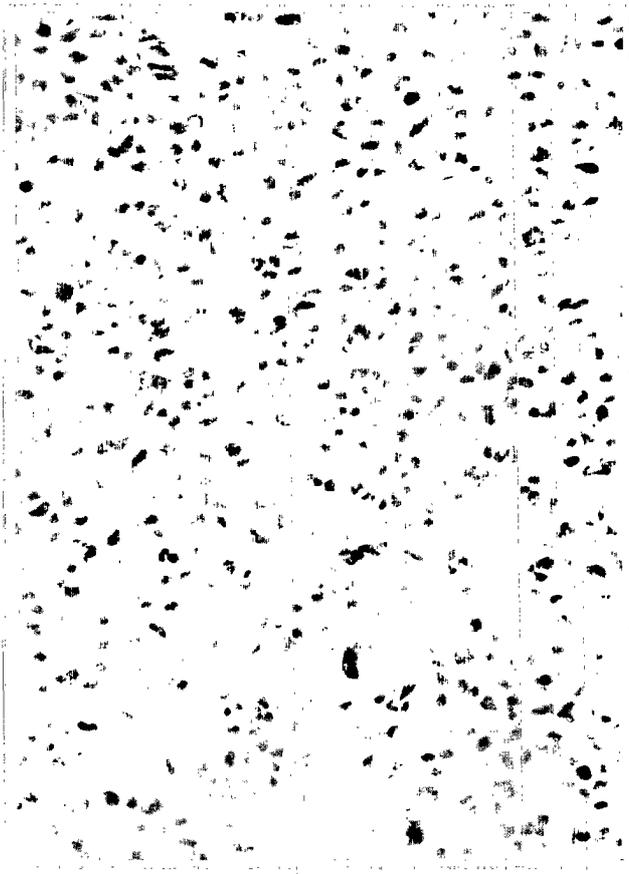


Figura 4. Proliferación astrocitaria atípica caracterizada por una marcada densidad celular e intensa atipia citológica correspondiente a un glioblastoma (original, HE $\times 200$).

que escapan a la apoptosis acumulan daños genómicos muy variados, algunos de los cuales son los determinantes de su comportamiento biológico agresivo. Llama la atención que en el glioblastoma el filamento intermedio característico de los astrocitos como es la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) tiende a desaparecer y, por el contrario, se produce la expresión aberrante de una amplia variedad de moléculas propias del epitelio, como son las citoqueratinas y el antígeno de membrana epitelial, o de otro tipo, entre los que cabe destacar la proteína S-100, la $\alpha 1$ -antiquimotripsina o los marcadores musculares.

Los glioblastomas multiformes pueden ser histológicamente heterogéneos en lo que respecta al grado; es decir, que siendo tumores de alto grado pueden incluir áreas de un grado menor. También pueden mostrar una acusada heterogeneidad mor-

fológica, haciendo gala a su nombre, entremezclándose en el mismo tumor áreas de células epitelioideas, células pequeñas, células fusiformes, células estrelladas, células gigantes, células escamosas y células que conforman estructuras glandulares.

Tres características clínicas llaman la atención del glioblastoma: el rápido crecimiento tumoral, la resistencia del glioblastoma al tratamiento citostático o/y radioterápico y la limitada capacidad metastatizante del tumor que, de mostrarla, se manifiesta habitualmente como metástasis intracraneales.

En los estudios de CGH se observa que el glioblastoma muestra un gran número de alteraciones cromosómicas, superior al de los astrocitos de bajo grado (4).

Aspectos moleculares relevantes de los glioblastomas multiformes

El glioblastoma multiforme es el tipo de astrocitoma en que más se han estudiado las alteraciones moleculares. El glioblastoma multiforme presenta una gran variedad de alteraciones génicas (Tabla 4). Entre ellas destaca por su frecuencia la alteración de los genes implicados en el control del ciclo celular CDKN2A/2B-CDK4,CDK6/ciclina D1-RB, que se producen en la inmensa mayoría de los glioblastomas, y que ya vimos que aparecían alterados en los astrocitos de bajo grado en proceso de malignización. De ellos destaca por su frecuencia la inactivación del gen CDKN2A (27).

Se pueden considerar alteraciones génicas frecuentes y propias del glioblastoma, ya que están raramente presentes en el astrocitoma anaplásico, la amplificación del cromosoma 7 (80% a 90% de los casos) y la delección del cromosoma 10 (45% a 60%), que parece ser un acontecimiento génico tardío (7).

Ciertas alteraciones cromosómicas muestran una clara tendencia a asociarse o, por el contrario, a excluirse mutuamente. Así, por ejemplo, la alteración génica de los genes interrelacionados CDKN2A/2B-CD4,6/ciclina D1-RB (88% a 94% de los glioblastomas) es frecuente y no se producen simultáneamente en un mismo tumor (7, 13). De entre ellas destacan la inactivación del gen CDKN2A generalmente por delección homocigótica (30% a 60% del total), alteración combinada de mutación y pér-

Tabla 4. Alteraciones génicas y cromosómicas más relevantes del glioblastoma multiforme.

Región cromosómica	Gen	Proteína	Mecanismo e incidencia
4q11-12 5q33-35	Gen del PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas	Sobreexpresión
7p12-13 y cromosomas dobles diminutos	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico, en forma de proteína truncada o normal	Amplificación (50%), reordenamiento, sobreexpresión
1q21-22	CDK6	Ciclincinasa	Amplificación
9p21	CKN2A/CDKN2B	p16 (inhibidor de cinasa 4 o INK4a)/p15	Delección homocigótica, delección hemizigótica, hipermetilación del promotor y mutación (rara) (33% a 68%)
10q23	PTEN/MMAC1 (25%)	Proteína con actividad tirosin-fosfatasa	Delección y mutación asociadas (28%)
10q25-26	MXI1? PAX-2? DMBT1?	¿ ?	Delección (60% a 85%)
11p15.5	¿Gen supresor?	¿ ?	Delección
12q13-14	CDK4,6 (15%)	Ciclincinasa	Amplificación (15%)
12q14.3	MDM2 (10%)	Proteína que interactúa con la proteína p53	Amplificación (5% a 10%)
13q14	RB1	pRb	Mutación, pérdida de heterocigosidad (20% a 40%)
17p	TP53	P53	Mutación, delección cromosómica (30% a 40%)
18q21	DCC	Molécula de adhesión	Delección, raramente mutación y transcritos aberrantes (43% a 88%)
19q13.3	Gen supresor. BAX?	¿ ?	Delección (40%)
22q12.3-13.1	¿Gen supresor?	¿ ?	Delección
22q13.3	¿Gen supresor?	¿ ?	Delección

didada de heterocigosidad del otro alelo del gen RB (30% a 40%) y amplificación o sobreexpresión del gen CDK4 (10% a 20%). Los mecanismos de inactivación del gen CDKN2A descritos en el glioblastoma han sido la delección homocigótica o heterocigótica, siendo más frecuente la primera, e hipermetilación del promotor (27, 28). La relación de genes implicados y los correspondientes mecanismos de alteración génica figuran en la Tabla 4.

En cuanto a las asociaciones génicas se observa que: la delección del gen CDKN2A se asocia a la amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (45); la amplificación del gen EGFR se asocia a su vez a la pérdida

del cromosoma 10 (7), y la pérdida del cromosoma 10 se asocia a la mutación en el otro alelo del gen PTEN/MMAC1.

En experimentos de transducción multigénica en líneas celulares de glioblastomas se demuestra que para que se produzca un efecto inhibitorio de la proliferación celular ejercido por el gen CDKN2A es necesario que la proteína del retinoblastoma sea funcional (31). También se ha observado que la activación de dicho gen induce inhibición del crecimiento tumoral y activación de la diferenciación celular (46).

El gen MDM2 se encuentra amplificado o sobreexpresado en los glioblastomas (47). Este gen

codifica una fosfoproteína que actúa como un factor de transcripción. Esta proteína tiene hasta cinco variantes, dos de las cuales interaccionan con la proteína p53. El efecto final de la amplificación o sobreexpresión de la pmdm2 es el bloqueo de la p53, facilitando de este modo la progresión tumoral.

Invasividad tisular

La infiltración tumoral de las células astrogiales malignas depende de una compleja expresión de una serie de enzimas, inhibidores enzimáticos, moléculas receptoras y proteínas de la matriz extracelular, integrinas y factores de crecimiento, todas ellas producidas por las células tumorales malignas. Entre las enzimas son especialmente relevantes las metaloproteinasas (48), catepsina B y cisteína y serín proteasas. Entre los inhibidores enzimáticos destacan los de las metaloproteinasas (TIMPS). Se han detectado en las células tumorales diversas moléculas de membrana receptoras de la matriz extracelular como la CD44, moléculas de adhesión neural, tenascina y vitronectina. A esta complejidad hay que añadir un supuesto factor de motilidad tumoral del que todavía se desconoce su implicación en la invasión tumoral (49).

Otras moléculas de adhesión alteradas descritas en el glioblastoma son las conocidas como las moléculas de adhesión de la célula neuroglial (NCAM L1) y la molécula de adhesión neurológica humana (hNr-CAM). La molécula CD24 es una glicoproteína unida al grupo glicosilfosfatidilinositol que estimula la migración de la célula tumoral (50). De la importancia que las moléculas de adhesión neural tienen en la invasividad dan idea los experimentos de transferencia de genes en líneas celulares de glioblastoma, como por ejemplo la transfección de la molécula de adhesión neural 140 que impide que el tumor invada y prolifere (38).

Existen una serie de factores de crecimiento sobreexpresados en el glioblastoma que también estimulan la migración celular, en parte debido al aumento de la proliferación celular. Son (51): el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico beta (FGF-beta), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta 2), el

factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), en especial del IGF-2. Estos factores de crecimiento son con frecuencia variantes de los que se pueden detectar en la glía normal: así, el IGF-2, el FGFR beta 1 o el TGF beta 1 y beta 2.

El producto del gen PTEN, frecuentemente deletado en los glioblastomas, es una fosfatasa que regula las acciones entre las células y la matriz extracelular de tal forma que puede inhibir el crecimiento, la invasión, la migración y la adhesión focal (52).

La invasividad está en parte ligada a la capacidad de proliferación. Esto explicaría por qué la inactivación de ciertos genes supresores como el CDKN2 o el RB anula la capacidad de invasión tumoral (27, 31).

Angiogénesis y edema

Varios factores de crecimiento, como el VEGF, el FGF beta y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), son sustancias producidas por las células tumorales que tienen propiedades angiogénicas debido al efecto activador sobre los receptores correspondientes en la célula endotelial. De ellos es el VEGF el que tiene una mayor potencialidad angiogénica (53). Recientemente se ha demostrado experimentalmente en ratones que la transfección del gen antisentido del VEGF inhibe la proliferación del glioblastoma (54).

El glioblastoma experimenta un crecimiento superior al aporte nutricio vascular, lo que conlleva la aparición de hipoxia y necrosis. La hipoxia es un factor inductor importante de la síntesis del VEGF y en consecuencia del desarrollo de vasos. Esto explica por qué en las áreas cercanas a las zonas de necrosis se reconocen numerosos vasos. Es posible que la presencia de una intensa producción de factores de crecimiento vascular sean los determinantes de la característica arquitectura anómala de los vasos. Por otra parte, el VEGF es un factor que altera de forma importante la permeabilidad vascular, lo que justifica el intenso edema peritumoral que acompaña al tumor.

También ciertas alteraciones moleculares propician el desarrollo vascular. Se ha demostrado que la delección del cromosoma 10 induce angiogénesis, posiblemente a través de la disminución en la sín-

tesis de trombospondina, que es una molécula que bloquea el desarrollo vascular (55).

Apoptosis

Numerosos factores modulan el desarrollo de la apoptosis tumoral, como las proteínas bcl-2 y bax, que interactúan entre ellas, la pRb, la p53, la molécula CD95 (Fas) y la proteína mdm2. Factores como la molécula Fas y su ligando son sintetizadas en la mayoría de los glioblastomas así como la molécula bcl-2 (56). En la actualidad aún no se disponen de estudios suficientes sobre el grado de expresión del bcl-2 en los glioblastomas. Se ha demostrado que la expresión baja del gen BCL-2 en los glioblastomas ejerce un efecto proapoptótico, pero la alta expresión produce el efecto contrario a través de la molécula Fas (57). En cultivos de líneas celulares de glioblastomas se ha observado que la sobreexpresión del gen BAX induce la apoptosis tumoral si la p53 es funcional (58).

Proliferación celular

La proliferación celular de los glioblastomas es en general muy marcada –valor medio de un 15% a 20% en términos de inmunorreactividad para el antígeno Ki-67–. La justificación de la alta actividad proliferativa característica del glioblastoma podría estar en el efecto aditivo de la alteración de varios genes supresores, como CDKN2A/2B o RB (27, 32), que son mutuamente excluyentes, y el TP53, junto con el efecto inductor del crecimiento derivado de los factores de crecimiento citados sintetizados por la célula tumoral.

El EGFR es un receptor de membrana dotado de la capacidad de fosforilar tirosinas, de especial implicación en el desarrollo del glioblastoma. El gen

del EGFR es el más frecuentemente amplificado en los glioblastomas. La amplificación de este gen puede dar lugar a la aparición de cromosomas dobles diminutos. Dos aspectos relacionados con el EGFR parecen especialmente interesantes en el mantenimiento de la actividad proliferativa del glioblastoma: la síntesis continuada del EGFR y de su correspondiente ligando, y la síntesis de receptores de EGF anómalos (truncados), debido al reordenamiento y amplificación del gen (59), que no son internalizados para su posterior degradación, con lo que el efecto inductor de la proliferación no se anula. Como resultado final el EGF activa el complejo CDK-ciclina D, lo que produce la hiperfosforilación (inactivación) de la pRb y en consecuencia el incremento en la proliferación celular (Fig. 2).

Alteraciones moleculares de los glioblastomas pediátricos frente a los del adulto

Los glioblastomas pediátricos representan aproximadamente el 7% de todos los tumores cerebrales en los niños. Son habitualmente infratentoriales a diferencia de los del adulto, que son mayoritariamente supratentoriales. Las alteraciones moleculares de los glioblastomas pediátricos (primarios) parecen ser diferentes de las del adulto como consecuencia de mecanismos de carcinogénesis diversos (Tabla 5).

Alteraciones moleculares de los glioblastomas primarios frente a los secundarios

Los glioblastomas primarios o *de novo* y los glioblastomas secundarios presentan características cli-

Tabla 5. Alteraciones génicas de los glioblastomas pediátricos respecto a los del adulto.

Pediátricos	Del adulto
Mutación del gen TP53/pérdida del cromosoma 17p: frecuente	Mutación del gen TP53/pérdida del cromosoma 17p: frecuente en glioblastomas secundarios; rara en los primarios
Amplificación del EGFR: rara	Amplificación del EGFR: rara en los glioblastomas secundarios; frecuente en los primarios

Tabla 6. Características clinicopatológicas y alteraciones moleculares de los glioblastomas primarios frente a glioblastomas secundarios.

Glioblastoma secundario	Glioblastoma primario
Jóvenes	Adultos
Precedido de un astrocitoma de grado II o III	No hay astrocitoma grado II o III previo
Relativo mejor pronóstico	Peor pronóstico
EGFR raro	EGFR frecuente
Mutación del gen TP53/pérdida del cromosoma 17p: frecuente	Mutación del gen TP53/pérdida del cromosoma 17p: rara
Pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10: infrecuente	Pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10: frecuente
Amplificación del gen MDM2: rara	Amplificación del gen MDM2: frecuente

nicopatológicas y alteraciones moleculares distintas (Tabla 6). El EGF está más frecuentemente amplificado en los glioblastomas primarios, mientras que el gen TP53 se inactiva especialmente en los secundarios. La delección del cromosoma 10 tiende a ser total en los glioblastomas primarios, mientras que en los secundarios es del cromosoma 10q (60). En general, los glioblastomas secundarios tienen mejor pronóstico que los primarios, lo que puede justificarse por el mecanismo de carcinogénesis implicado (Tabla 6) (61). Una variante clinicopatológica especial es el glioblastoma posradioterapia, que muestra un perfil de alteraciones génicas muy parecido al propio de los glioblastomas *de novo* convencionales (62).

Utilidad de la inmunohistoquímica en el estudio molecular de los astrocitomas

En primer lugar hay que insistir en que el estudio inmunohistoquímico de los productos génicos no aporta información segura sobre el estado del gen o, dicho de otra manera, que el estudio inmunohistoquímico no puede reemplazar al análisis genético. Así, por ejemplo, esto queda muy bien ejemplificado para el caso de la proteína p53. Es cierto que la detección inmunohistoquímica marcada de la proteína p53 se asocia a la mutación del gen correspondiente, pero la correlación es muy deficiente en los astrocitomas (5). Esto hace que los estudios de correlación pronóstica basados exclusivamente en

el estudio inmunocitoquímico de la proteína p53 en los astrocitomas tengan poco valor.

Sin embargo, sí se pueden extraer ciertas correlaciones entre los resultados de los estudios inmunohistoquímico y genético en los astrocitomas. Por ejemplo, existe una clara correlación entre la presencia de inmunorreactividad para el pRb en el tumor y la conservación de ambos alelos del correspondiente gen, pero esto no excluye la presencia de mutación (63). Por el contrario, la ausencia de inmunorreactividad para la proteína se correlaciona con una doble alteración del gen RB: pérdida de heterocigosidad de un alelo combinada con mutación del otro alelo (28) o la presencia de mutación bialélica (10, 27). Una cuestión particular por resolver es el significado de la intensa inmunorreactividad para la pRb que se observa frecuentemente en los astrocitomas de alto grado. Por lo que respecta a la proteína p16, la inmunonegatividad se asocia a la delección homocigota del gen CDKN2A (13), y la inmunopositividad puede deberse a un estado de sobreexpresión del gen (13, 28). Por último, para la ciclina D1 la intensidad de inmunorreactividad se correlaciona con el estado de sobreexpresión/amplificación del gen (35).

En general podemos decir que para ciertas proteínas oncosupresoras –p53, pRb, p16– el porcentaje de células marcadas es mayor en los astrocitomas de alto grado que en los de bajo grado, y que esta diferencia es estadísticamente significativa (Fig. 5).

Si bien no puede considerarse estrictamente una alteración molecular, la valoración de la actividad

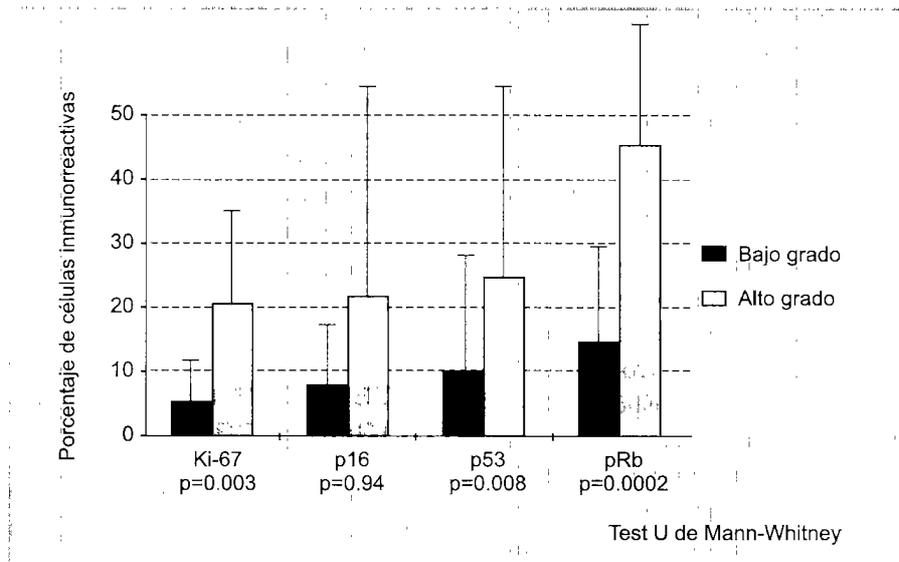


Figura 5. Representación gráfica comparativa de los resultados inmunohistoquímicos de varias proteínas oncosupresoras y del antígeno Ki-67 en los astrocitomas de bajo y alto grado.

proliferativa en los astrocitomas de bajo grado parece tener un carácter pronóstico. Esta valoración puede llevarse a cabo por varias técnicas, pero las más usuales son la detección inmunohistoquímica del antígeno Ki-67 y la cuantificación de la fase S mediante citofluorometría. En los astrocitomas de alto grado se aprecia con frecuencia una marcada heterogeneidad intratumoral para la actividad proliferativa (Fig. 6). Los astrocitomas de bajo grado tienen en general una actividad proliferativa inferior al 5% en términos de porcentaje de núcleos marcados utilizando anticuerpos frente al antígeno

Ki-67, a diferencia de los astrocitomas de alto grado que tienen valores medios del 20% (Fig. 5). Los astrocitomas de bajo grado con una actividad proliferativa mayor del 5% tienden a exhibir una mayor tendencia a la recidiva y a la malignización y, a la postre, una menor supervivencia (64).

Alteraciones moleculares de utilidad pronóstica o terapéutica

La intensa investigación molecular no ha dado lugar todavía a conocimientos de clara utilidad pronóstica

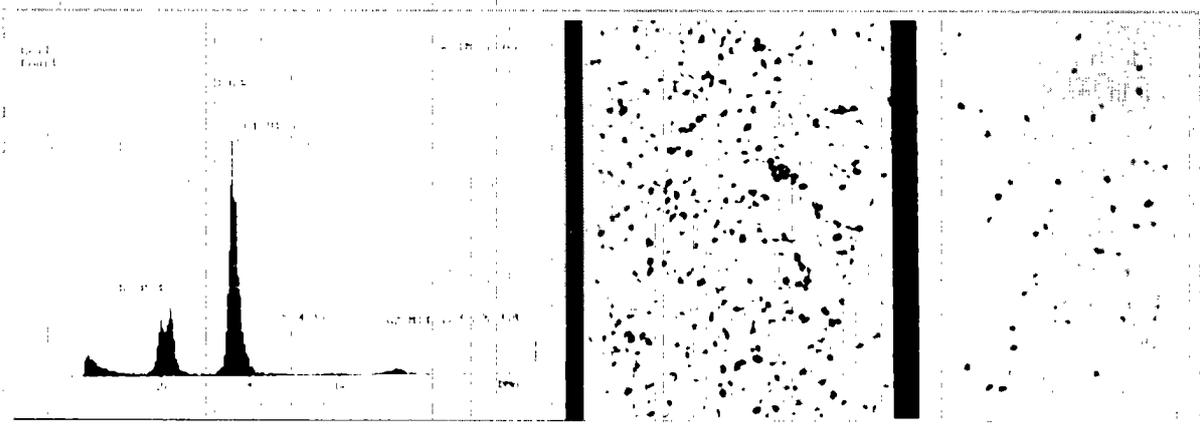


Figura 6. Resultado inmunohistoquímico para un glioblastoma en el que se aprecia la marcada heterogeneidad intratumoral para la actividad proliferativa valorado mediante técnicas de inmunohistoquímica (Ki-67) y citometría de flujo. La cuantificación de la fase S se correlaciona mejor con áreas de baja actividad proliferativa.

o terapéutica. Sin embargo, hay algunas alteraciones moleculares que se postulan de valor.

Si bien se trata de estudios preliminares, es posible que la demostración de un número relativo alto de daños génicos en los astrocitomas de bajo grado pueda ser utilizado como indicativo de un peor pronóstico (4).

Aunque todavía es prematuro afirmarlo con rotundidad es probable que la inactivación aislada o combinada de los genes supresores, en especial TP53, DCC, CDKN2 y RB en los astrocitomas de bajo grado, tenga un carácter pronóstico (40, 42, 65). En este sentido vale la pena reseñar que recientemente se ha publicado que la mutación del gen TP53 en los astrocitomas de bajo grado se asocia significativamente a una mayor tendencia a la progresión (66).

Respecto a los astrocitomas de alto grado, los resultados preliminares apuntan a que la delección del gen RB en los astrocitomas anaplásicos se correlaciona con un peor pronóstico (32). También se ha postulado el posible carácter pronóstico de la pérdida del gen DCC (43). Por otra parte, en los glioblastomas, y de especial interés en los astrocitomas anaplásicos, la combinación de la delección del cromosoma 10 y la amplificación del EGFR parece indicar un peor pronóstico (67). El resto de alteraciones moleculares, en especial la mutación del gen TP53, no ha mostrado un carácter pronóstico (68, 69).

Otro aspecto de interés es la predicción de la respuesta tumoral frente al tratamiento. Éste es un aspecto muy complejo del que todavía sólo existen algunas aproximaciones. Ya hemos comentado anteriormente que en general estos tumores responden mal a la quimiorradioterapia. Se postula que la sobreexpresión del gen p21^{WAF-1} tiene que ver con esta resistencia tumoral (70). El estudio de las moléculas o los genes que intervienen en la apoptosis en relación con la respuesta al tratamiento ha aportado resultados dispares. En concreto, se aprecia que la presencia de una p53 funcional en las células tumorales parece predecir una buena respuesta a la radioterapia (71). Pero, por otra parte, no se ha demostrado correlación entre la inmunorreactividad de varias proteínas determinantes de la apoptosis (bcl-2, bcl-X y bax) y la respuesta a la quimioterapia (72).

Algunos autores han sugerido que la hipermetilación del promotor del gen de ciertas proteínas de reparación del DNA puede justificar la quimiorresistencia de los astrocitomas de alto grado (73, 74).

Como una aplicación práctica real no debemos olvidar que el conocimiento detallado de la oncogénesis es fundamental para el diseño de una terapia génica orientada a bloquear dicha malignización (31, 47, 75).

ALTERACIONES MOLECULARES DEL OLIGODENDROGLIOMA

Los oligodendrogliomas son gliomas de origen oligodendroglial que presentan bastantes semejanzas de comportamiento con los astrocitomas.

Oligodendroglioma de bajo grado

Histopatológicamente, los oligodendrogliomas de bajo grado se caracterizan por el carácter de célula poligonal de citoplasma claro y una rica vascularización de vasos capilares interconectados. No se observan figuras mitóticas y nunca hay necrosis.

Las alteraciones del oligodendroglioma no se conocen en la misma medida que las del astrocitoma. Las alteraciones descritas figuran en la Tabla 7. Destacan por su incidencia la pérdida de los cromosomas 1p y 19q (76), si bien las regiones diana no se conocen todavía. Recientemente se ha postulado al gen CDKN2C, que se localiza en la región 1p32, como posiblemente implicado en la oncogénesis de los oligodendrogliomas (77). Con frecuencia ambas alteraciones génicas tienden a darse conjuntamente. Otras alteraciones génicas frecuentemente identificadas mediante CGH son las pérdidas de los cromosomas 4, 14, 15 y 18 (76).

Oligodendroglioma anaplásico

Los rasgos histopatológicos propios del oligodendroglioma anaplásico son similares a los constitutivos del glioblastoma con la salvedad de que retienen los rasgos propios del oligodendroglioma. Las alteraciones más frecuentes consisten en la pérdida de heterocigidad del cromosoma 19q13.3-13.4.

Tabla 7. Alteraciones génicas y cromosómicas más relevantes de los oligodendrogliomas.

Región cromosómica	Gen	Proteína	Mecanismo e incidencia
1p	¿CDKN2C?	P18INK4C (proteína reguladora del ciclo celular)	Pérdida de heterocigosidad (73%)
7p12-13	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	Sobreexpresión (50%)
4q	¿?	¿?	Deleción
11p	¿?	¿?	Deleción
17p	TP53	p53	Mutación (10% a 15%)
19q13.2-13.4	¿Gen supresor?	¿?	Pérdida de heterocigosidad (50% a 80%)
22q	¿Gen supresor?	¿?	Pérdida de heterocigosidad

Son especialmente frecuentes la deleción de los cromosomas 10 y 9p y la amplificación de los genes EGFR y CDK4. El gen CDKN2A aparece implicado en la malignización de los oligodendrogliomas al igual que ocurre con los astrocitomas (78). No parece que el gen PTEN, localizado en la región 10q23, esté implicado en la oncogénesis de los oligodendrogliomas anaplásicos (79). Otras alteraciones génicas propias del oligodendroglioma anaplásico figuran en la Tabla 8.

Mecanismo de malignización de los oligodendrogliomas

Se postula que los mecanismos implicados en la malignización de los oligodendrogliomas son pare-

cidos a los de los astrocitomas (20). Así, en los oligodendrogliomas anaplásicos se observa deleción de los cromosomas 9p, gen CDKN2 y 10q que también se pierden en los glioblastomas. Respecto a la apoptosis, llama la atención que la expresión de la proteína bcl-2 se incrementa con la malignización del oligodendroglioma (80).

Alteraciones moleculares con matiz pronóstico

La valoración de la actividad proliferativa se ha mostrado de significado pronóstico como factor independiente (81). Se postula que la pérdida alélica del cromosoma 1p en el oligodendroglioma es un buen factor predictivo de quimiosensibilidad. Si

Tabla 8. Alteraciones génicas y cromosómicas más relevantes de los oligodendrogliomas anaplásicos.

Región cromosómica	Gen	Proteína	Mecanismo e incidencia
1p	¿CDKN2C?	¿p18?	Pérdida de heterocigosidad (84%)
7p12-13	EGFR (50%)	Receptor del FCE	Amplificación/sobreexpresión
9p21	CDKN2A/CDKN2B (33% a 68%)	p16	Deleción homocigótica, hemizigótica, hipermetilación del promotor y mutación raras. Pérdida de heterocigosidad de la región 9p (42%)
10q	¿Gen supresor?	¿?	Deleción
12q13-14	CDK4 (15%)	Ciclincinasa	Amplificación (15%)
19q13.2-13.4	¿?	¿?	Pérdida de heterocigosidad

además el tumor muestra la delección del cromosoma 19q es probable que el paciente disfrute de un periodo de tiempo libre de enfermedad relativamente más largo (82, 83). Por el contrario, la delección del gen CDKN2A en los oligodendrogliomas anaplásicos indica un peor pronóstico (82). Además, es posible que la detección de la delección del cromosoma 10q en un oligodendroglioma de bajo grado se asocie a una mayor propensión a la malignización (84).

ALTERACIONES MOLECULARES DE LOS EPENDIMOMAS

Además del endimoma convencional existen variantes clinicopatológicas especiales como son el endimoma mixopapilar y el subendimoma, cuya oncogénesis no se trata en este trabajo.

La variante benigna de endimoma se conoce como endimoma de bajo grado, o de forma breve endimoma, y la variante maligna como endimoma anaplásico.

De una forma general se puede decir que la oncogénesis de los endimomas no tiene nada en común con la de los astrocitomas u oligodendrogliomas.

Ependimoma de bajo grado

El endimoma de bajo grado es un tumor benigno de origen endimario que puede afectar a niños o adultos. Se puede localizar en el cerebro o en la médula espinal. Histológicamente se caracteriza por células poligonales que se disponen formando unas estructuras características denominadas rosetas perivasculares o endimarias. Es un tumor que invade según un frente de crecimiento expansivo. La actividad proliferativa es ligera.

Las alteraciones génicas propias de los endimomas convencionales son en gran medida desconocidas. No parece que los genes TP53, CDKN2A/2B, EGFR, CDK4 o ciclina D1 estén implicados (85). El hallazgo más relevante en los endimomas es la pérdida de heterocigosidad del cromosoma 22. El gen NF2, localizado en la región cromosómica 22q12, parece estar implicado en la on-

cogénesis de los endimomas espinales, pero no en la de los hemisféricos (86, 87). Se postula que el gen P73 que codifica una proteína oncosupresora se encuentra sobreexpresado en los endimomas (88). Se conoce una amplia variedad de alteraciones citogenéticas en los endimomas que afectan a los cromosomas 9, 11 y 22, entre los que destacan la delección de los cromosomas 6q –especialmente en niños– (89), 9q, 10 (delección y monosomía) y 13, y trisomía del cromosoma 7, monosomía del 21 y pérdida de los cromosomas sexuales (90).

Ependimoma anaplásico

Se caracteriza desde el punto de vista histopatológico por ser un tumor compuesto por células poligonales dispuestas de forma compacta, intensa proliferación vascular, marcada densidad celular, atipia, necrosis y un frente de crecimiento infiltrativo. En ocasiones pueden reconocerse algunas estructuras propias de los endimomas como son las rosetas, seudorrosetas perivasculares y túbulos.

Como en el caso de los endimomas de bajo grado, no se conoce cuáles son las alteraciones génicas propias de los endimomas anaplásicos. Sí se han descrito una serie de alteraciones citogenéticas como son la delección de los cromosomas 9p y 10, pérdida de heterocigosidad del cromosoma 17 y monosomía de los cromosomas 9, 11, 17 y 22 (91).

Mecanismos de malignización de los endimomas

Aún no se conoce la posible secuencia de alteraciones moleculares implicadas en la malignización de los endimomas (91). La intensa actividad proliferativa propia de los endimomas anaplásicos permite sospechar que ciertos genes supresores y factores de crecimiento deben estar implicados, pero éstos todavía se encuentran sin definir. Tampoco se han descrito alteraciones moleculares con matiz pronóstico.

ALGUNOS APUNTES METODOLÓGICOS

Para el estudio adecuado de las alteraciones génicas de los gliomas es necesario utilizar varias técni-

cas moleculares que son complementarias: fundamentalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (9, 28, 29) y la técnica de CGH. La razón de esto radica en: A) las limitaciones inherentes a cada técnica (92). La técnica más utilizada en la actualidad para la detección de la deleción génica es a través de la demostración de la pérdida de la heterozigosis (LOH) mediante PCR. La PCR tiene una gran sensibilidad, ya que permite identificar deleciones pequeñas. Sin embargo, la técnica de PCR puede originar falsos negativos debido a que las deleciones estudiadas no estén localizadas en la porción de DNA testado por las sondas o por contaminación con DNA de tejido normal (92). Por otra parte, la técnica de FISH no permite detectar deleciones pequeñas. Por ello, es conveniente complementar la PCR con la técnica de FISH. En concreto, la PCR mediante microsatélites es muy útil para la detección de las deleciones pequeñas y la técnica del FISH para la detección de las deleciones hemizigóticas. La técnica más utilizada para la detección de la deleción homocigótica es la PCR múltiple (30). La técnica de CGH permite una valoración global de las pérdidas y ganancias del genoma tumoral. B) Para el estudio de la proteína existen básicamente tres métodos: la inmunohistoquímica, la técnica de *Western-blotting* y la hibridación *in situ* de RNA mensajero. C) Si bien el material idóneo para la realización de las técnicas de PCR o CGH es el tejido congelado, el material de parafina también puede ser de utilidad (93, 94).

BIBLIOGRAFÍA

1. Polednak AP. *Estimating the prevalence of cancer in the United States*. Cancer 1997; 80: 136-141.
2. Jaros E, Perry RH, Adam L, Kelly, PJ, Crawford PJ, Kalbag RM y cols. *Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours*. Br J Cancer 1992; 66: 373-385.
3. Raghavan R, Steart PV, Weller RO. *Cell proliferation patterns in the diagnosis of astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme: A Ki-67 study*. Neuropathol Appl Neurobiol 1990; 16: 123-133.
4. Sallinen S, Sallinen P, Haapasalo H, Kanonen J, Karhu R, Helen P y cols. *Accumulation of genetic changes is associated with poor prognosis in grade II astrocytomas*. Am J Pathol 1997; 151: 1799-1807.
5. Louis DN, von Deimling A, Chung RY, Rubio MP, Whaley JM, Eibl RH y cols. *Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors*. J Neuropathol Exp Neurol 1993; 52: 31-38.
6. Van Meyel DJ, Ramsay DA, Casson AG, Keeney M, Chambers AF, Caimeros JG. *P53 mutation, expression and DNA ploidy in evolving gliomas: Evidence for two pathways of progression*. J Natl Cancer Inst 1994; 86: 1011-1017.
7. Louis DN. *A molecular genetic model of astrocytoma histopathology*. Brain Pathol 1997; 7: 755-764.
8. Hermanson M, Funa K, Koopman J, Maintz D, Waha A, Westermarck B y cols. *Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas*. Cancer Res 1996; 56: 164-171.
9. Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, von Deimling A, Fassbender F, Xu HJ y cols. *The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas*. Ann Neurol 1994; 36: 714-721.
10. Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP. *Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4,6 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene*. Oncogene 1996; 13: 1065-1072.
11. Moulton T, Samara G, Chung WY, Yuan L, Desai R, Sisti M y cols. *MTS1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme*. Am J Pathol 1995; 146: 613-619.
12. Piva R, Cavalla P, Bortolotto S, Cordera S, Grosso R, Richiardi P, Dutto A, Schiffer D. *CDKN2/p16 inactivation and p16 immunohistochemistry in astrocytic gliomas*. Int J Oncol 1998; 12: 55-58.
13. Nishikawa R, Furnari FB, Lin H, Arap W, Berger MS, Cavenee WK, Su Huang HJ. *Loss of p16^{INK} expression is frequent in high grade gliomas*. Cancer Res 1995; 55: 1941-1945.
14. Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. *Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation*. Oncogene 1997; 15: 2755-2765.
15. Ino Y, Siver JS, Blazejewski L, Nishikawa R, Matsutani M, Von Deimling A y cols. *Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade*. J Neuropathol Exp Neurol 1999; 58: 881-885.
16. Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laws ER Jr. *Human malignant astrocytoma xenografts migrate in rat brain: A model for central nervous system cancer research*. J Neurosci Res 1989; 22: 134-143.
17. Kuppner MC, Van Meir E, Gauthier T, Hamou MF, de Tribolet N. *Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours*. Int J Cancer 1992; 50: 572-577.
18. Carroll RS, Zhang J, Chauncey BW, Chantziara K, Frosch MP, Black PM. *Apoptosis in astrocytic neoplasms*. Acta Neurochir (Wien) 1997; 139: 845-850.
19. Weller M, Kleihues P, Dichgans J, Ohgaki H. *CD95 ligand: Lethal weapon against malignant glioma?* Brain Pathol 1998; 8: 285-293.
20. Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. *Role of gemistocytes in astrocytoma progression*. Lab Invest 1997; 76: 277-284.

21. Kleihues P, Cavenee WK. *Pathology & Genetics. Tumours of the Nervous System*. International Agency for Research on Cancer. Lyon 1997.
22. Cavenee WK. *Accumulation of genetic defects during astrocytoma progression*. Cancer 1992; 70: 1788-1793.
23. Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK. *Genetics and malignant progression of human brain tumors*. Cancer Surv 1995; 25: 233-275.
24. Oskam NT, Buleveld EH, Hulsebos JM. *A region of common deletion in 22q13.3 in human glioma associated with astrocytoma progression*. Int J Cancer 2000; 85: 336-339.
25. Maddalena AS, Hainfellner JA, Hegi ME, Glatzel M, Aguzzi A. *No complementation between TP53 or RB-1 and v-src in astrocytomas of GFAP-v-src transgenic mice*. Brain Pathol 1999; 9: 627-637.
26. Steilen-Gimbel H, Steudel WI, Feiden W, Moringlane JR, Henn W, Zang KD. *Genetic heterogeneity in human astrocytomas: Spatial distribution of P16 and TP53 deletions in biopsies*. Cancer Genet Cytogenet 1999; 113: 115-119.
27. Ono Y, Tamiya T, Ichikawa T, Kunishio K, Matsumoto K, Furuta T y cols. *Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have a higher Ki-67 proliferation indices*. J Neuropathol Exp Neurol 1996; 55: 1026-1031.
28. Burns KL, Ueki K, Jhung SL, Koh J, Louis DN. *Molecular genetic correlates of p16, CD46, and pRB immunohistochemistry in glioblastomas*. J Neuropathol Exp Neurol 1998; 57: 122-130.
29. Tsuzuki T, Tsunoda S, Sakaki T, Konishi N, Hiasa Y, Nakamura M. *Alterations of retinoblastoma, p53, p16 (CDKN2), and p15 genes in human astrocytomas*. Cancer 1996; 78: 287-293.
30. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efrid JT, von Deimling A, Louis DN. *CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated*. Cancer Res 1996; 56: 150-153.
31. Costanzi-Strauss E, Strauss BE, Naviaux RK, Haas M. *Restoration of growth arrest by p16INK4, p21WAF1, pRB and p53 is dependent on the integrity of the endogenous cell-cycle control pathway in human glioblastoma cell lines*. Exp Cell Res 1998; 238: 51-62.
32. Nakamura M, Konishi N, Tsunoda S, Hiasa Y, Tsuzuki T, Inui T, Sakaki T. *Retinoblastoma protein expression and MIB-1 correlate with survival of patients with malignant astrocytoma*. Cancer 1997; 80: 242-249.
33. Barker FG, Chen P, Furman F, Aldape KD, Edwards MS, Israel MA. *P16 deletion and mutation analysis in human brain tumors*. J Neurooncol 1997; 31: 17-23.
34. Simon M, Koster G, Menon AG, Schramm J. *Functional evidence for a role of combined CDKN2A (p16-p14(ARF)/CDKN2B (p15) gene inactivation in malignant gliomas*. Acta Neuropathol (Berl) 1999; 98: 444-452.
35. Sallinen S, Sallinen PK, Kononen JH, Syrjakoski KM, Nupponen NN, Rantala I y cols. *Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis*. J Pathol 1999; 188: 289-293.
36. Furuwatari C, Yagi A, Yamagami O, Ishikawa M, Hidaka E, Ueno I y cols. *A comprehensive system to explore p53 mutations*. Am J Clin Pathol 1998; 110: 368-373.
37. Li YJ, Hoang-Xuan K, Zhou XP, Sanson M, Mokhtari K, Faillot T y cols. *Analysis of the p21 gene in gliomas*. J Neurooncol 1998; 40: 107-111.
38. Edvardsen K, Pedersen PH, Bjerkvig R, Hermann GG, Zeuthen J, Laerum OD, Walsh FS, Bock E. *Transfection of glioma cells with the neural-cell adhesion molecule NCAM: Effect on glioma-cell invasion and growth in vivo*. Int J Cancer 1994; 58: 116-122.
39. Moriyama T, Kataoka H, Seguchi K, Tsubouchi H, Koono M. *Effects of hepatocyte growth factor (HGF) on human glioma cells in vitro: HGF acts as a motility factor in glioma cells*. Int J Cancer 1996; 66: 678-685.
40. Schenck AC, Coons SW. *Expression of the tumor suppressor gene DCC in human gliomas*. Cancer Res 1993; 53: 5605-5609.
41. Fueyo J, Gómez-Manzano C, Yung WK, Kyritsis AP. *The functional role of tumor suppressor genes in gliomas: Clues for future therapeutic strategies*. Neurology 1998; 51: 1250-1255.
42. Reyes-Mugica M, Rieger-Christ K, Ohgaki H, Ekstrand BC, Helie M, Kleinman G y cols. *Loss of DCC expression and glioma progression*. Cancer Res 1997; 57: 382-386.
43. Nakatani K, Yoshimi N, Mori H, Sakai H, Shinoda J, Andoh T, Sakai N. *The significance of the expression of tumor suppressor gene DCC in human gliomas*. J Neurooncol 1998; 40: 237-242.
44. Ekstrand B, Mansfield TA, Bigner SH, Fearon ER. *DCC expression is altered by multiple mechanisms in brain tumors*. Oncogene 1995; 11: 2393-2402.
45. Hayashi Y, Ueki K, Waha A, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A. *Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme*. Brain Pathol 1997; 7: 871-875.
46. Fueyo J, Gómez-Manzano C, Yung WK, Liu TJ, Alemany R, Bruner JM y cols. *Suppression of human glioma growth by adenovirus-mediated Rb gene transfer*. Neurology 1998; 50: 1307-1315.
47. Matsumoto R, Tada M, Nozaki M, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H. *Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms*. Cancer Res 1998; 58: 609-613.
48. Nakada M, Nakamura H, Ikeda E, Fujimoto N, Yamashita J, Sato H y cols. *Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors*. Am J Pathol 1999; 15: 417-428.
49. Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T, Kawahara K, Katō K, Katinuma A. *Purification of motility factor (GMF) from human malignant glioma cells and its biological significance in tumor invasion*. Biochem Biophys Res Commun 1993; 193: 518-525.
50. Senner V, Sturm A, Baur I, Schrell U, Distel L, Paulus W. *CD24 promotes invasion of glioma cells*. J Neuropathol Exp Neurol 1999; 58: 795-802.
51. Pilkington GJ. *Tumor cell migration in the central nervous system*. Brain Pathol 1994; 4: 157-166.
52. Tamura M, Gu J, Danen EH, Takino T, Miyamoto S, Yamada KM. *PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway*. J Biol Chem 1999; 274: 20693-20703.

53. Plate KH. *Mechanisms of angiogenesis in the brain*. J Neuro-pathol Exp Neurol 1999; 58: 313-320.
54. Im SA, Gómez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Ke LD, Kim JS y cols. *Antiangiogenesis treatment for gliomas: Transfer of anti-sense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo*. Cancer Res 1999; 59: 895-900.
55. Hsu SC, Volpert OV, Steck PA, Mikkelsen T, Polverini PJ, Rao S y cols. *Inhibition of angiogenesis in human glioblastomas by chromosome 10 induction of thrombospondin-1*. Cancer Res 1996; 56: 5684-5691.
56. Husain N, Chiocca EA, Rainov N, Louis DN, Zervas NT. *Co-expression of Fas and Fas ligand in malignant glial tumors and cell lines*. Acta Neuropathol (Berl) 1998; 95: 287-290.
57. Shinoura NN, Yoshida Y, Nishimura M, Muramatsu Y, Asai A, Kirino T y cols. *Expression level of Bcl-2 determines anti- or proapoptotic function*. Cancer Res 1999; 59: 4119-4128.
58. Vogelbaum MA, Tong JX, Perugu R, Gutmann DH, Rich KM. *Overexpression of bax in human glioma cell lines*. J Neurosurg 1999; 91: 483-489.
59. Goike HM, Asplund AC, Pettersson EH, Liu L, Sanoudou D, Collins VP. *Acquired rearrangement of an amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in a human glioblastoma xenograft*. J Neuropathol Exp Neurol 1999; 58: 697-701.
60. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P y cols. *Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas*. Lab Invest 2000; 80: 65-72.
61. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. *Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas*. Acta Neuropathol (Berl) 1997; 94: 303-309.
62. Brat DJ, James CD, Jedlicka AE, Connolly DC, Chang E, Castellani RJ y cols. *Molecular genetic alterations in radiation-induced astrocytomas*. Am J Pathol 1999; 154: 1431-1438.
63. Geradts J, Kratzke RA, Crush-Stanton S, Wen SF, Lincoln CE. *Wild type and mutant retinoblastoma protein in paraffin sections*. Mod Pathol 1996; 9: 339-347.
64. Montine TJ, Vandersteenhoven JJ, Aguzzi A, Boyko OB, Dodge RK, Kerns BJ y cols. *Prognostic significance of Ki-67 proliferation index in supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms*. Neurosurgery 1994; 34: 674-678.
65. Kraus JA, Bolln C, Wolf HK, Neumann J, Kindermann D, Fimmers R y cols. *TP53 alterations and clinical outcome in low grade astrocytomas*. Genes Chromosomes Cancer 1994; 10: 143-149.
66. Ishii N, Tada M, Hamou MF, Janzer RC, Meagher-Villemure K, Wiestler OD y cols. *Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumors evolve clonally to malignancy and are an unfavorable prognostic factor*. Oncogene 1999; 18: 5870-5878.
67. Leenstra S, Oskam NT, Bijleveld EH, Bosch DA, Troost D, Hulsebos TJ. *Genetic sub-types of human malignant astrocytoma correlate with survival*. Int J Cancer 1998; 79: 159-165.
68. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL y cols. *Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes*. Brain Pathol 1998; 8: 655-667.
69. Nieder C, Petersen S, Petersen C, Thames HD. *The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in gliomas*. Cancer Treat Rev 2000; 26: 67-73.
70. Ruan S, Okcu MF, Ren JP, Chiao P, Andreeff M, Levin V y cols. *Overexpressed WAF1/Cip1 renders glioblastoma cells resistant to chemotherapy agents 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin*. Cancer Res 1998; 58: 1538-1543.
71. Shu HK, Kim MM, Chen P, Furman F, Julin CM, Israel MA. *The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression*. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 14.453-14.458.
72. Rieger L, Weller M, Bornemann A, Schabet M, Dichgans J, Meyermann R. *BCL-2 family protein expression in human malignant glioma: A clinical-pathological correlative study*. J Neurol Sci 1998; 155: 68-75.
73. Esteller M, Hamilton R, Burger P, Baylin SR, Herman JG. *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia*. Cancer Res 1999; 59: 793-797.
74. Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, Dugan M, Bigner SH, Henry AJ, Ashley DM y cols. *DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to temodal in newly diagnosed malignant glioma*. J Clin Oncol 1998; 16: 3851-3857.
75. Andreansky SS, Gillespie GY, Sorocenu L, Market J, Cjou J, Roizman B. *The applications of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 11.313-11.318.
76. Bigner SH, Matthews MR, Rasheed BK, Wiltshire RN, Friedman HS, Friedman AH y cols. *Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization*. Am J Pathol 1999; 155: 375-386.
77. Pohl U, Cairncross JG, Louis DN. *Homozygous deletions of the CDKN2C/p18INK4C gene on the short arm of chromosome 1 in anaplastic oligodendrogliomas*. Brain Pathol 1999; 9: 639-643.
78. Bigner SH, Matthews MR, Rasheed BK, Wiltshire RN, Friedman HS, Friedman AH y cols. *Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization*. Am J Pathol 1999; 155: 375-386.
79. Zhou XP, Li YJ, Hoang-Xuan K, Laurent-Puig P, Mokhtari K, Longy M y cols. *Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: Molecular and pathological correlations*. Int J Cancer 1999; 84: 150-154.
80. Deininger MH, Weller M, Streffer J, Meyermann R. *Antiapoptotic bcl-2 family protein expression increases with progression of oligodendroglioma*. Cancer 1999; 86: 1832-1839.
81. Kros JM, Hop WC, Godschalk JJ, Krishnadath KK. *Prognostic value of the proliferation-related antigen Ki-67 in oligodendrogliomas*. Cancer 1996; 78: 1107-1113.
82. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS y cols. *Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas*. J Natl Canc Inst 1998; 90: 1473-1479.
83. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM y cols. *Alterations of chromosome arms 1p and 10q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas*. J Clin Oncol 2000; 18: 636.

84. Rosso SM, van Dekken H, Krishnadath KK, Alers JC, Kros JM. *Detection of chromosomal changes by interphase cytogenetics in biopsies of recurrent astrocytomas and oligodendrogliomas.* J Neuropathol Exp Neurol 1997; 56: 1125-1131.
85. Sato K, Schauble B, Kleihues P, Ohgaki H. *Infrequent alterations of the p15, p16, CDK4 and cyclin D1 genes in non-astrocytic human brain tumors.* Int J Cancer 1996; 66: 305-308.
86. Hulsebos TJ, Oskam NT, Bijleveld EH, Westerveld A, Hermesen MA, van denOuweland AM, Hamel BC, Tijssen CC. *Evidence for an ependymoma tumour suppressor gene in chromosome region 22pter-22q11.2.* Br J Cancer 1999; 81: 1150-1154.
87. Ebert C, von Haken M, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T y cols. *Molecular genetic analysis of ependymal tumors. NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas.* Am J Pathol 1999; 155: 627-632.
88. Loiseau H, Arsaut J, Demotes-Mainard J. *p73 gene transcripts in human brain tumors: Overexpression and altered splicing in ependymomas.* Neurosci Lett 1999; 26: 173-176.
89. Reardon DA, Entrekin RE, Sublett J, Ragsdale S, Li H, Boyett J, Kepner JL, Look AT. *Chromosome arm 6q loss is the most common recurrent autosomal alteration detected in primary pediatric ependymoma.* Genes Chromosomes Cancer 1999; 24: 230-237.
90. Ebert C, von Haken M, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T y cols. *Molecular genetic analysis of ependymal tumors. NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas.* Am J Pathol 1999; 155: 627-632.
91. Rogato SR, Casartelli C, Rainho CA, Barbieri-Neto J. *Chromosomes in the genesis and progression of ependymomas.* Cancer Genet Cytogenet 1993; 69: 146-152.
92. Perry A, Nobori T, Ru N, Anderl K, Borell TJ, Mohapatra G, Feuerstein BG, Jenkins RB, Carson DA. *Detection of p16 gene deletions in gliomas: A comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) versus quantitative PCR.* J Neuropathol Exp Neurol 1997; 56: 999-1008.
93. Louis DN, von Deimling A, Seizinger BR. *A (CA)_n dinucleotide repeat assay for evaluating loss of allelic heterozygosity in a small and archival human brain tumor specimens.* Am J Pathol 1992; 141: 777-782.
94. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. *Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples.* Am J Pathol 1994; 145: 1301-1308.