

Artículo original

ROL DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN BIOPSIAS ESTEREOTÁXICAS DE GLIOMAS

C.G. Yampolsky, H. Molina, G.A. Larrarte y A.G. Carrizo

¹Servicio de Neurocirugía, Hospital Santa Lucía, Buenos Aires.

²Servicio de Patología, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires

RESUMEN

La biología molecular y la genética han aportado diversos marcadores biológicos tumorales que brindan información sobre el comportamiento de las neoplasias, incluidas las del SNC. El antígeno PCNA (proliferating cell nuclear antigen) es una proteína nuclear, sintetizada en las fases G1 tardía y S del ciclo celular. Es una proteína auxiliar de la enzima delta-adn-polimerasa y se halla comprometida en la replicación del ADN. Su presencia indica que la célula ha iniciado o se halla en algún estadio de la replicación celular o proliferación.

En el cromosoma 17p existe un área que codifica una proteína denominada p53, la que normalmente es producida por las células y actúa inhibiendo los procesos de replicación celular. El gen de la p53 es supresor de la proliferación y pertenece al grupo de los oncogenes, ya que una mutación a ese nivel llevaría a la producción de una proteína incapaz de inhibir la replicación celular. El PCNA, la sobreexpresión del p53 y la amplificación del gen del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) tendrían un valor pronóstico en los gliomas astrocíticos del SNC.

Estudiamos 31 pacientes portadores de tumores gliales a quienes efectuamos biopsias estereotácticas seriadas. Para establecer el grado histológico utilizamos la Clasificación de Daumas-Duport de 1 a 4. Evaluamos la utilidad de la marcación de PCNA, p53 y EGFR en los extendidos citológicos de biopsias estereotácticas seriadas. **Palabras clave:** Astrocitomas, estereotaxia, biología molecular.

ABSTRACT

Molecular biology and cytogenetics have become exciting fields of investigation that gives information about the oncogenesis of CNS tumors. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) is an auxiliary protein of deoxyribonucleic acid polymerase and is involved in DNA replication. Is maximally expressed in the S phase and has been applied to the investigation of brain tumor kinetic activity.

The p53 gene, located in the short arm of chromosome 17, codes for a nuclear protein involved in the regulation of cell division and is a tumor suppressor gene. The mutations of the p53 gene tend to produce a protein not able to go on with cell division inhibition. The PCNA, mutation and overexpression of p53 and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) amplification, may have importance in the overcome of astrocytic tumors.

Thirty one patients with astrocytic tumors underwent serial stereotactic biopsies. Histological grading was performed by the use of the Daumas-Duport system grading from 1 to 4. We evaluated the expression of PCNA, p53 and EGFR to compare with other clinical characteristics.

Key words: Astrocytic tumors, Stereotaxy, Molecular genetics.

INTRODUCCIÓN

Se presume que en la oncogénesis de los gliomas astrocíticos intervienen diversas anomalías, especialmente genéticas, que llevan a la existencia de gliomas de bajo grado de malignidad. La sumatoria de otros eventos en las células tumorales sería la responsable de la evolución hacia la malignidad.

La biología molecular y la genética han aportado diversos marcadores biológicos tumorales que brindan información sobre el comportamiento de las neoplasias, incluidas las del S.N.C.

En el cromosoma 17 p existe un área que codifica una proteína denominada p53, la que normalmente es producida por las células y actúa inhibiendo los procesos de replicación celular. Esa proteína denominada p53 «wild», se produce en pequeña cantidad y tiene una vida muy corta por lo cual es imposible detectarla con los métodos inmunohistoquímicos convencionales^{4,10}.

El gen de la proteína p53 es supresor de la proliferación y pertenece al grupo de los oncogenes, ya que una mutación a ese nivel llevaría a la producción de una proteína incapaz de inhibir la replicación celular. Al producirse esta mutación se produce una p53 anómala, que generalmente resiste la degradación rápida, se acumula en los núcleos, y podemos detectarla por inmunohistoquímica^{4,10}.

El antígeno PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) es una proteína nuclear sintetizada en las fases G1 tardía y S del ciclo celular. Es una proteína auxiliar de la enzima delta-ADN- polimerasa y se halla comprometida en la replicación del ADN. Su presencia indica que la célula ha iniciado o se halla en algún estadio de la replicación celular o proliferación⁵.

El gen del receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es el más frecuente protooncogén amplificado y sobreexpresado en glioblastomas^{17,18,20}. El gen del EGFR también se ve sobreexpresado en carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide, cáncer pancreático y carcinoma de mama. En estos tumores se ha descrito que la activación moderada del gen del EGFR llevaría a una estimulación del crecimiento tumoral, mientras que una máxima activación inhibiría su crecimiento¹³. Sin embargo en los gliomas el nivel de expresión del gen del EGFR estaría directamente relacionado y podría predecir la respuesta de crecimiento al EGF²⁰.

Presentamos nuestra experiencia en el estudio de biopsias estereotáxicas de tumores astrocíticos y la utilidad de la metodología empleada para el estudio de p53, PCNA y EGFR.

PACIENTES Y MÉTODOS

Estudiamos 31 pacientes portadores de tumores astrocíticos a quienes efectuamos biopsias estereotáxicas seriadas entre junio de 1993 y junio de 1995.

Las edades oscilaron entre 42 y 84 años (promedio: 62.29; mediana: 64; desvío estándar: 11.326). Dieciséis pacientes fueron de sexo masculino y 15 de sexo femenino. El Karnofsky Performance Status osciló entre 30 y 90 (promedio: 50; mediana: 60; desvío estándar: 13.1247)²⁵. El tiempo de evolución de la sintomatología hasta la realización de la biopsia fue de 2 a 36 meses (promedio: 7; mediana: 6; desvío estándar: 6.255). La manifestación clínica más frecuente en nuestra serie fueron las cefaleas (29/31), luego los signos deficitarios motores (hemiparesia) en 23/31 y convulsiones en sólo 5 de nuestros 31 casos. En cuanto a la topografía, 20 tumores se localizaban en hemisferios cerebrales (10 en 1 solo lóbulo y 10 en 2 o más), 6 en cuerpo calloso y 5 en ganglios de la base, tálamo y tronco cerebral. Catorce tumores se lateralizaban a derecha, 11 a izquierda y existían 6 procesos de línea media. (Tabla 1).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas

Caso	Edad	Sexo	KPS	T. ev.	Cef.	Hem.	Conv.
1	65	F	50	3	X	X	
2	47	F	80	6	X		
3	51	F	70	12	X		
4	72	M	60	6	X	X	
5	42	M	60	6			X
6	52	M	70	8	X	X	
7	68	F	60	4	X	X	
8	66	F	60	8	X	X	
9	62	F	80	14	X		
10	62	F	80	5	X	X	
11	72	M	60	7	X	X	X
12	45	F	50	36		X	
13	58	M	60	8	X		
14	53	M	80	9	X	X	
15	45	M	80	8	X	X	X
16	65	M	60	2	X	X	
17	84	M	60	3	X	X	
18	66	M	50	4	X	X	
19	64	F	50	6	X		
20	72	F	60	5	X	X	
21	62	F	60	3	X	X	
22	74	F	60	5	X	X	
23	75	M	80	12	X		
24	72	M	60	2	X	X	
25	78	F	50	6	X	X	X
26	64	M	40	12	X	X	
27	68	M	80	2	X	X	
28	51	M	60	3	X	X	
29	45	M	30	6	X	X	
30	53	F	80	6	X	X	
31	78	F	50	3	X	X	

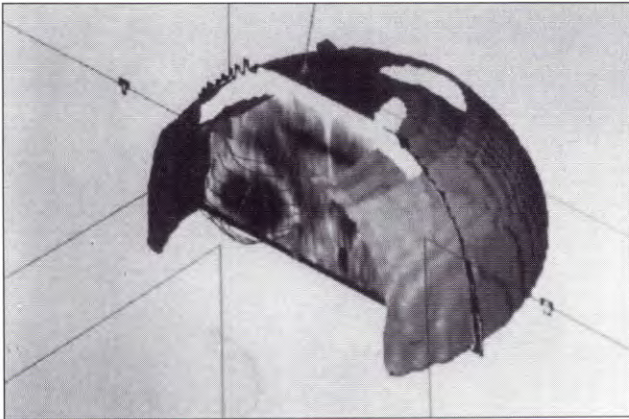


Fig. 1. Reconstrucción volumétrica tridimensional de un astrocitoma

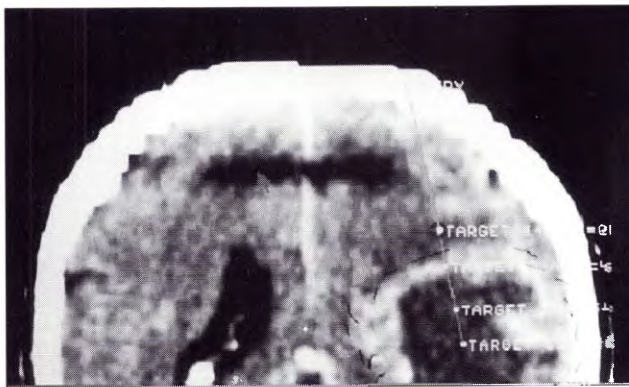


Fig. 2. Reconstrucción coronal de TAC con selección de blancos

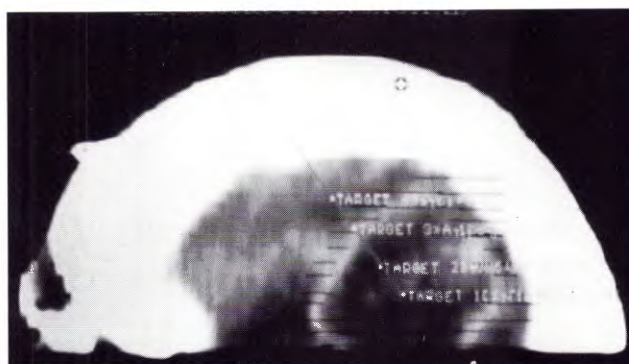


Fig. 3. Reconstrucción sagital de TAC con selección de blancos

El criterio de selección de los pacientes para este procedimiento consistió en lesiones ubicadas en áreas funcionales o estructuras cerebrales importantes (ejemplo: áreas perirrolándicas, Broca, tálamo, ganglios basales, tronco, etc.), edad avanzada (mayor de 70 años) y/o Karnofsky Performance Status igual o menor de 60²⁵. La biopsia

estereotáxica se realizó en base a datos obtenidos por tomografía computada (Fig. 1). Las coordenadas estereotáxicas fueron transferidas al arco isocéntrico y se tomaron muestras de los blancos preestablecidos en forma horaria con intervalos de 45 grados en el eje de la aguja de biopsia de Seddan. (Figs. 2 y 3).

ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS INTRAOPERATORIOS

Para el examen de las biopsias se tomó un pequeño fragmento de cada extremidad del cilindro extraído, se extendieron en un portaobjeto fijándolos en metanol y coloreándolos con la técnica de hematoxilina - floxina; las preparaciones fueron deshidratadas, aclaradas y montadas con DPX (Fluka Lab, California).

La gradación histológica de los gliomas se realizó mediante los criterios sugeridos por Catherine Daumas - Dauport adjudicando 1 punto a cada una de las alteraciones observadas y graduándolos de esta manera desde astrocitoma G I a astrocitoma G IV⁶.

En algunos casos, a fin de evaluar la configuración espacial, cada una de las muestras fue identificada considerando la zona en que se obtenía (tumor, interfase tumor - edema, edema perilesional) con tomas cada 10 mm (-20 mm, -10 mm, target, +10 mm, +20 mm). La clasificación de la configuración espacial se realizó siguiendo los criterios de Daumas - Duport, quien distingue 3 tipos de configuración: Tipo 1, corresponde a un tumor con límites bien definidos, escaso edema periférico y ausencia de infiltración por células neoplásicas aisladas; Tipo 2, masa tumoral definida con edema e infiltración del tejido encefálico circundante por células neoplásicas aisladas y Tipo 3, ausencia de masa tumoral definida, la neoplasia crece infiltrando las estructuras encefálicas mediante células aisladas⁷.

ESTUDIOS ANATOMOPATOLÓGICOS DIFERIDOS

Las muestras fueron fijadas en metanol, incluidas en parafina y los cortes de 5 micras de grosor se colorearon con hematoxilina y floxina y, según las necesidades del caso, también se colorearon con Pa-Schiff, reticulina de Gomori, luxol fast blue para mielina e inmunomarcaciones diagnósticas como proteína ácida gliofibrilar, proteína S 100, citoqueratinas, vimentina y otros, mediante la técnica de avidina- biotina peroxidasa.

En todos los casos se investigó la existencia de proteína p53, del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la marcación del antígeno de proliferación celular (PCNA), mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los antígenos (Dako, Dinamarca), diluidos a concentraciones adecuadas en buffer fosfato salino (PBS) 0.05 M y pH 7,4. Brevemente, los cortes histológicos fueron deshidratados, la peroxidasa endógena se inhibió con peróxido de hidrógeno al 0.03 % durante 30 minutos, luego de tres lavados con PBS, se bloquearon los receptores Fc y otros sitios de uniones inespecíficas mediante la incubación con suero normal de cabra 1/20 en PBS y luego de tres lavados se colocaron los anticuerpos monoclonales para los diferentes antígenos investigados, dejándolos en incubación durante 24 hs. Luego de los lavados se aplicó el segundo antisuero específico, conejo anti Igbs de ratón ligado a biotina y finalmente, luego de otro lavado con PBS, se incubaron por 30 minutos con el complejo streptavidina-peroxidasa (Dako, Dinamarca). La reactividad de la marcación se evidenció con diaminobenzidina más peróxido de hidrógeno y, como contraste, se usó hematoxilina 1/10 en agua destilada sin virado posterior, deshidratándose y montándose en DPX.

Como controles positivos se usaron cortes de glioma reactivo para los tres antígenos y como controles negativos, los anticuerpos específicos fueron reemplazados por PBS o suero normal de ratón 1/20 en PBS. En ninguno de los controles negativos se observó reactividad, mientras que en los controles positivos siempre se obtuvo buena marcación.

La cuantificación se realizó en las áreas más representativas. Utilizando un cuentaglóbulo se evaluaron varios campos y contaron más de 500 células por caso y por antígeno investigado. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas para una reacción con respecto al total de células neoplásicas del sector.

RESULTADOS

Se diagnosticaron en nuestra serie 16 astrocitomas G IV (glioblastoma multiforme), 8 astrocitomas G III (astrocitoma anaplásico) y 7 astrocitomas G II.

En la población de pacientes de más de 60 años ($n = 20$), existe una mayor incidencia de tumores de alto grado de malignidad comparados con los de la 5ta. y 6ta. década de la vida (17/20 contra 7/11).

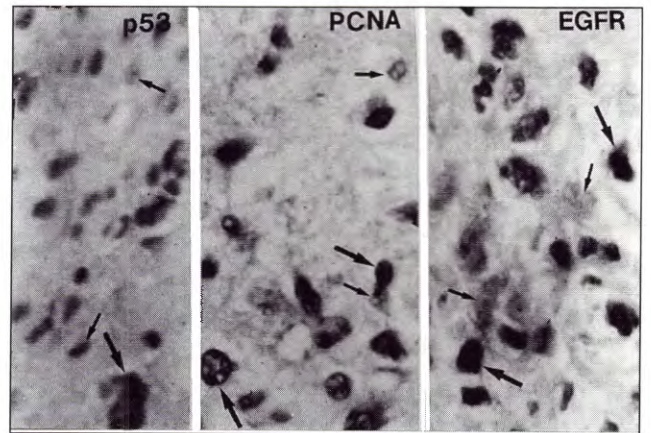


Fig. 4. Reactividad de la inmunomarcación para p53, PCNA y EGFR (flechas)

Los resultados de la evaluación inmunohistoquímica cuantitativa se resumen en la Tabla 2.

En los 16 pacientes con astrocitomas G IV encontramos inmunomarcación positiva para PCNA en los 16 casos (promedio de reactividad expresado en porcentaje: 40.8; mediana: 43; desvío estándar: 7.738), EGFR positiva en 12 casos (promedio de reactividad expresado en porcentaje: 44.46; mediana: 52; desvío estándar: 28.472) y sobreexpresión de p53 en 10 casos (promedio de reactividad expresado en porcentaje: 13.06; mediana: 16; desvío estándar: 9.647). (Fig. 4).

De los 9 pacientes portadores de astrocitomas G III, 8 presentaban positividad en el antígeno PCNA (promedio de reactividad expresado en porcentaje: 39.12; mediana: 31; desvío estándar: 13.932), 6 positivos en el gen del EGFR (promedio de reactividad expresado en porcentaje: 35.12; mediana: 32; desvío estándar: 26.476) y 2 en la proteína p53 (promedio de reactividad expresado en porcentaje: 9; mediana: 2.5; desvío estándar: 14.010).

Los 7 pacientes con astrocitomas G II presentaban PCNA positivo (promedio de reactividad expresado en porcentaje: 32; mediana: 25; desvío estándar: 16.451, 2 EGFR positivos (promedio de reactividad expresado en porcentaje: 7.71; mediana: 5; desvío estándar: 9.707) y en 4 encontramos sobreexpresión de p53 (promedio de reactividad expresado en porcentaje: 15; mediana: 12; desvío estándar: 11.284). (Gráficos 1 y 2).

En 16 de los 31 casos se efectuó radioterapia luego de la confirmación histológica, en 1 caso realizamos radioterapia intersticial (braquiterapia) con semillas de I 125. En ningún caso utilizamos quimioterapia asociada o como único tratamiento.

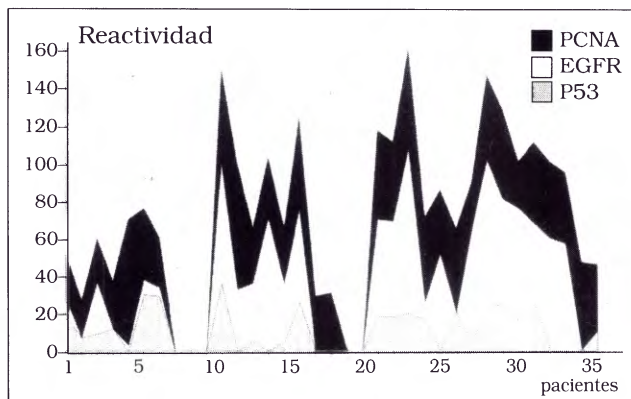


Gráfico 1. Relación entre la reactividad a EGFR, PCNA y p53 entre los pacientes portadores de astrocitomas GII, III y IV

De los 31 pacientes estudiados, 20 fallecieron entre las 4 y 26 semanas de realizado el procedimiento. Los 11 restantes se mantienen estables con un seguimiento que oscila entre 1 y 24 meses. Sólo 4 de los 16 pacientes portadores de astrocitomas G IV sobreviven con un seguimiento de 1 a 4 meses, los 12 restantes fallecieron entre 4 y 18 semanas después de realizada la biopsia. Entre los astrocitomas G III 6 pacientes fallecieron entre 1 semana y 10 meses y los otros 2 continúan en control a 1 y 15 meses de realizada la biopsia respectivamente. Finalmente, entre los portadores de astrocitomas G II, 3 fallecieron entre 8 y 18 semanas y los 4 restantes se encuentran estables con un seguimiento de 12 a 24 meses.

DISCUSIÓN

Los tumores gliales son los más frecuentes tumores cerebrales primitivos en el adulto. La mayor parte de ellos son astrocitomas de alto grado de malignidad y su pronóstico es muy desfavorable independientemente de la terapéutica utilizada. Por este motivo la exploración del rol de los diferentes oncogenes y protooncogenes en la génesis de los tumores gliales ha resultado una de las principales formas de investigación biológica de estos tumores^{1,3,8,16,18}.

Los oncogenes han sido individualizados como secuencias genómicas de origen viral responsables de la inducción de algunos cánceres en el animal. Secuencias emparentadas encontradas en el seno del genoma humano normal, han sido denominadas protooncogenes. Estos genes intervienen en la transducción de una señal que surge de la unión de un factor de crecimiento a su receptor hasta desencadenar la mitosis¹⁴.

Los tumores primarios humanos han sido aso-

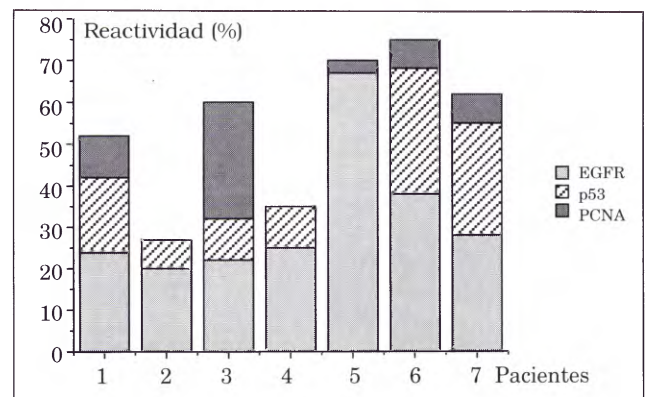


Gráfico 2. Pacientes portadores de astrocitomas GII. Porcentaje de reactividad

ciados frecuentemente con anomalías de protooncogenes, ya sea a través de la desactivación de genes supresores tumorales o por la activación de oncogenes dominantes estimulantes del crecimiento tumoral.

Es de interés establecer si existe un oncogén específico para cada tumor en particular y el rol de la oncogénesis en el establecimiento del tumor y la progresión tumoral.

El receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es el más frecuente protooncogén amplificado y sobreexpresado en astrocitomas Grado IV (glioblastomas multiformes). Se trata de una glicoproteína transmembranar de 170 kDa. Su porción extracelular sirve para unirse a distintos ligandos como EGF y TGF (Tumor Growth Factor). La porción intracitoplasmática transduce la señal inducida por la unión al ligando. El gen del EGFR también se ve sobreexpresado en carcinoma hepatocelular, carcinoma epidermoide, cáncer pancreático y carcinoma de mama. En estos tumores la activación moderada del EGFR lleva a una estimulación del crecimiento, mientras que una máxima activación inhibe su crecimiento¹³. En los gliomas se sugiere que el nivel de la expresión de EGFR produciría la respuesta de crecimiento a EGF^{2,8,20}.

Recientes trabajos indican que el nivel de la expresión de EGFR en gliomas no predice directamente las respuestas de crecimiento del glioma a EGF. Esto indicaría que la función de EGFR en gliomas no se reduciría a mediar el efecto de crecimiento al EGF, sino que mediaría la extensión y efecto estimulante de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) y otros agentes promotores de la diferenciación²⁸. Berger y col. encuentran una amplificación del EGFR en 40 % de 25 gliomas estudiados (4 astrocitomas G III y 6 astrocitomas G IV)¹.

Coincidiendo con los diferentes autores el 80 % de los astrocitomas G IV en nuestra serie, presentaron una inmunomarcación positiva para EGFR. La cuantificación de los casos nos permitió obtener una media de 52 %.

El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), una proteína auxiliar de la delta - ADN - polimerasa, se ha utilizado recientemente para investigar la actividad cinética de los tumores cerebrales^{19,23}. En general el PCNA se expresa mayormente en fase S y, con menor frecuencia, en fases G1 y G2. La naturaleza cíclica del PCNA, valorada a través del ciclo celular, es compartida por las ciclinas, otro grupo de proteínas a las cuales se les atribuye la regulación de la síntesis de ADN y de la mitosis²¹. Louis y col. encontraron que el PCNA es un marcador más específico de la fase S en los gliomas de alto grado de malignidad¹⁹ que la Ki - 67.

Diversos análisis genéticos moleculares y citogenéticos sugieren que los gliomas malignos están compuestos por subpoblaciones heterogéneas de células con diferentes composiciones citogenéticas^{16,26}.

Darlymple y col. examinaron retrospectivamente una serie de 26 pacientes portadores de astrocitomas G IV a los cuales se les realizó una biopsia estereotáxica seriada a lo largo de una única trayectoria de la periferia del tumor hacia su centro. De esta manera demostraron que las regiones de máxima actividad mitótica en gliomas se extiende a través de los bordes del tumor, es decir la interfase entre el tumor sólido y el parénquima infiltrado⁵. Observamos en nuestra serie que el porcentaje de inmunomarcación positiva para PCNA se correlaciona con el grado de malignidad de los astrocitomas. Sin embargo los datos no alcanzan una significación estadística.

El gen de la proteína p53 localizado en el brazo corto del cromosoma 17 funciona como un regulador negativo del ciclo celular, deteniendo la célula en fase G1 en presencia de daño en el ADN para permitir su reparación^{15,22}. Si la reparación fracasa la p53 puede desencadenar la muerte por apoptosis. Sin embargo las células tumorales en las cuales la p53 es inactivada por mutación o por una unión a proteínas huéspedes o virales, no pueden realizar este proceso. Como las mutaciones no se reparan, las células tumorales se convierten en genéticamente inestables y acumulan alteraciones adicionales a una gran velocidad.

La proteína p53 tipo Wild tiene una corta vida media y se expresa a bajos niveles en células normales. Las proteínas mutantes generalmente

tienen vidas medias más prolongadas y pueden ser detectadas por inmunohistoquímica debido a su acumulación⁹.

La mutación de la proteína p53 se ha encontrado frecuentemente en tumores astrocíticos de alto grado de malignidad^{10,11,27}. Se ha encontrado que la presencia de inmunorreactividad a p53 estaría asociada frecuentemente con astrocitomas malignos pero sería raramente detectada en pacientes añosos³. Esto sugeriría que la acumulación de la sobreexpresión de p53 pudiera ser un elemento predictivo de sobrevida más prolongada.

Chozick y col. analizan las implicancias pronósticas de la sobreexpresión de p53 en tumores astrocíticos y encuentran una correlación entre esta sobreexpresión y la sobrevida en pacientes con astrocitomas G II⁴. Por el contrario no hallan una relación entre sobreexpresión de p53 y sobrevida en astrocitomas G IV. Esto se debería a que las células tumorales conteniendo mutaciones en el gen p53 son genéticamente menos estables que las del gen p53 tipo *wild* y acumulan alteraciones adicionales a gran velocidad, facilitando la progresión a un estadio más maligno. De esta manera, una vez que el tumor ha progresado a un alto grado, la inactivación de la p53 representaría solo una de las muchas alteraciones genéticas presentes en el genotipo de la célula tumoral. Por ejemplo existen métodos alternativos para la inactivación de la p53 como la formación de complejos con la proteína MDM2. El gen MDM2 se encuentra amplificado y sobreexpresado en un subgrupo de astrocitomas malignos en los cuales no se detectan mutaciones en la p53²⁴. En contraste, los astrocitomas G II, con menos alteraciones genéticas, tendrían en la inactivación de la p53 una señal crítica para desarrollar un fenotipo más maligno²⁹.

Sin embargo nuestros resultados indican (Tabla 2) que el porcentaje de tumores con anomalías en la p53 es mayor en la población de más de 60 años. Estos hallazgos no avalarían la hipótesis de la modulación del gen p53 que, según algunos autores, conduciría a una disminución de dicha anomalía en los gliomas de alto grado⁴ y serían coincidentes con la teoría de la sumatoria de alteraciones o multicausalidad.

Existen diversas alteraciones genéticas que pueden relacionarse a la progresión de los tumores astrocíticos como : 1) alteración del gen supresor tumoral p53; 2) pérdida de heterocigocidad de los cromosomas 17p, 10p, 9p y 17q; 3) amplificación del gen EGFR; 4) amplificación del gen MDM2 y 5) amplificación infrecuente de los oncogenes N

Tabla 2. Inmunomarcación

Caso	Edad	Sexo	Grado	p53	EGFR	PCNA
1	65	F	II	18	10	24
2	47	F	II	7	0	20
3	51	F	II	9	28	23
4	72	M	II	12	0	25
5	42	M	II	0	3	67
6	52	M	II	30	8	38
7	68	F	II	29	5	27
8	66	F	III	36	65	48
9	62	F	III	0	33	67
10	62	F	III	5	31	29
11	72	M	III	0	71	32
12	45	F	III	5	31	29
13	58	M	III	0	50	48
14	53	M	III	26	0	29
15	45	M	III	0	0	31
16	65	M	IV	18	52	47
17	84	M	IV	18	51	42
18	66	M	IV	20	88	52
19	64	F	IV	16	10	45
20	72	F	IV	0	52	34
21	62	F	IV	20	0	45
22	74	F	IV	5	59	26
23	75	M	IV	23	79	44
24	72	M	IV	25	56	47
25	78	F	IV	16	60	25
26	64	M	IV	25	43	43
27	68	M	IV	0	60	41
28	51	M	IV	0	57	38
29	45	M	IV	0	0	47
30	53	F	IV	10	0	36
31	78	F	IV	16	68	42

- myc, c - myc, gli, N - ras, K - ras y PDGF-RA (platelet derived growth factor receptor A).

A partir de algunos de estos elementos se ha intentado estudiar los caminos que llevan a la formación de un astrocitoma G IV (glioblastoma

multiforme). Lang y col. identifican 3 vías genéticas, una estaría compuesta por los astrocitomas que presentan alteraciones en la p53 y representarían tumores que progresan desde astrocitomas de bajo grado¹⁴. Esta variante muestra frecuentemente alteraciones en el cromosoma 17. En un 75 % de estos tumores con pérdida de un alelo en el cromosoma 17p, se encuentran asociadas alteraciones en el gen de la proteína p53. La amplificación del EGFR fue rara pero tardía y en relación a la progresión tumoral. La segunda vía estaría caracterizada por astrocitomas sin alteración de la p53 y representaría tumores de alto grado clínicamente *de novo*. Estos tumores tendrían en un alto porcentaje amplificación del EGFR. Una tercera vía alternativa se vería en tumores sin alteraciones en la p53 ni otros cambios genéticos.

CONCLUSIONES

El número de casos presentado es pequeño para intentar obtener datos que tengan una implicancia clínica o nos orienten hacia lineamientos terapéuticos. Sin embargo, creemos necesario destacar el interés de la utilización de esta metodología para el correcto estudio de los astrocitomas. La posibilidad de estudiar aspectos genéticos y moleculares a través de biopsias estereotáxicas seriadas nos permitirá en el futuro seleccionar diferentes sectores de los tumores y analizar las características citogenéticas y biomoleculares de los mismos. La utilización de esta tecnología en grandes series de pacientes servirá para elaborar nuevas teorías acerca del desarrollo de las neoplasias primarias cerebrales y seleccionar las terapéuticas más adecuadas.

BIBLIOGRAFIA

- Berger Fr., Laine M., Hoffmann D., Verna J.M., Charffanet M., Chauvin Ch., Rost N., Nissou M.F., Benabid A.L. Etude de la voie du récepteur a l'EGF dans les tumeurs cérébrales humaines. Neurochirurgie 38: 257 - 266, 1992.
- Bigner S.H., Vogelstein B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastomas. Brain Pathol 1: 12 - 18, 1990.
- Chozick B.S., Weicker M.E. Pattern of mutant p53 expression in human astrocytomas suggests the existence of alternate pathways of tumorigenesis. Cancer 73: 406-415, 1994.
- Chozick B.S., Pezullo J.C., Epstein M.H., Finch P. W. Prognostic implications of p53 overexpression in supratentorial astrocytic tumors. Neurosurgery 35 (5): 831-838, 1994.
- Darlymple S.J., Paris J.E., Roche P.C., Ziesmer S.C., Scheithauer B.W., Kelly P.J. Changes in Proliferating Nuclear Antigen expression in glioblastoma multiforme cells along a stereotactic biopsy trajectory. Neurosurgery 35 (6): 1036 - 1045, 1994.
- Daumas-Duport C., Scheithauer B.W., O'Fallon J. Grading of astrocytomas: A simple and reproducible method. Cancer 62: 2152 - 2165, 1988.
- Daumas-Duport C., Scheithauer B.W., Kelly P.J. A histologic and cytologic method for spatial definition of gliomas. May Clin Proc 62: 435 - 449, 1987.
- Ekstrand A.J., Janus C.D., Cavenee W.K. Genes for EGFR, transforming growth factor alpha and EGF and their expression in human gliomas in vivo. Cancer Res 51: 2164 - 2172, 1991.
- Finlay C.A., Hinds P.W. Activating mutations for

- transformation of p53 produce a gene product that forms an hsc 70 - p53 complex with an altered half life. *Mol Cell Biol* 8: 531 - 539, 1988.
10. Fults D., Brockmeyer D., Tullous M.W., Peddone C.A., Cawthan R.M. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosome 17 and 10 during human astrocytomas progression. *Cancer Res* 52: 674 - 679, 1992.
 11. Jaros E., Perry R.H., Adam L. Prognostic implications of p53 protein, EGFR and Ki 67 labelling in brain tumors. *Br J Cancer* 66: 373 - 385, 1992.
 12. Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R.W. Participation of p53 protein in cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-6311, 1991.
 13. Kawamoto T., Mendelshon J., Le A. Relations of Epidermal Growth Factor Receptor concentration to growth of human epidermoid carcinoma A 431 cells. *J Biol Chem* 258: 7761 - 7766, 1984.
 14. Lang F., Miller D., Koslow M., Newcomb E. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 81: 427 - 436, 1994.
 15. Lane D.P. p53 guardian of the genome. *Nature* 358: 15 - 16, 1992.
 16. Leenstra S., Troost D., Westerveld A., Bosch D.A., Hulsebost J.M. Molecular characterization of areas with low grade tumor or satellitosis in human malignant astrocytomas. *Cancer Res* 52: 1568 - 1572, 1992.
 17. Liberman T.A., Razon N., Bartal A.D. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in human brain tumors. *Cancer Res* 44: 753 - 760, 1984.
 18. Liberman T.A., Nusbaum H.R., Razon N. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature* 313: 144 - 147, 1985.
 19. Louis D.N., Edgerton S., Thor A.D., Hedley-Whyte E.T. Proliferating Cell Nuclear Antigen and Ki 67 immunohistochemistry in brain tumors. A comparative study. *Acta Neuropathol* 81: 675 - 679, 1991.
 20. Lund Johansen M., Bjerkvig R., Humphrey P.A. Effect of Epidermal Growth Factor on glioma cell growth, migration and invasion in vivo. *Cancer Res* 50: 6039-6044, 1990.
 21. Maruno M., Kovach J.S., Kelly P.J. Transforming growth factor alpha, Epidermal Growth Factor Receptor and proliferating potential in benign and malignant gliomas *J Neurosurg* 75: 97 - 102, 1991.
 22. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M - phase. *Nature* 344: 503-508, 1990.
 23. Prelich G., Tan C.K., Kostora M., Matthews M.B., So A.G., Downey K.M., Stillman B. Functional identity of PCNA a DNA polimerase delta auxillari protein. *Nature* 326: 517 - 520, 1987.
 24. Reifemberger G., Liu L., Ichimura K., Schmidt E.E., Collins V.P. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 53: 2736-2739, 1993.
 25. Schag C.C., Heinreich R.L., Ganz P.A. Karnofsky Performance Status revisited: Reliability, validity and guidelines. *J Clin Oncol* 2: 187-193, 1984.
 26. Shapiro J.R., Yung W.A., Shapiro W.R. Isolation, karyotype and clonal growth of heterogeneous subpopulations of human malignant gliomas. *Cancer Res* 41: 2349-2359, 1981.
 27. Sidransky D., Mikkelsen T., Schwcheimer K., Rosenblum M.L., Cavenee W., Vogelstein B. Clonal expression of p53 mutant cell is associated with brain tumor progression. *Nature* 355: 846 - 847, 1992.
 28. Sung Ho U., Espiriru O., Kelley P.Y. The role of EGFR in human gliomas. II. The control of glial process extension and the expression of glial fibrillary acid protein. *J Neurosurg* 82: 847 - 857, 1995.
 29. Von Deimling A., Eibl R.H., Ohgak H. p53 mutations corralate with 17p allelic loss in Grade II and Grade III astrocytomas. *Cancer Res* 52: 2897-2990, 1992.