

## Identificación de alteraciones genéticas en oligodendrogliomas mediante amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (MLPA) (multiple ligation-dependent probe amplification)

C. Franco-Hernandez; V. Martínez-Glez; M. Torres-Martín; J.M. de Campos\*\*; A. Isla\*; J. Vaquero\*\*\*; C. Casartelli\*\*\*\* y J.A. Rey

Unidad de Investigación y \*Departamento de Neurocirugía, hospital Universitario La Paz, Madrid. \*\*Departamento de Neurocirugía, Fundación Jiménez Díaz, Madrid. \*\*\*Departamento de Neurocirugía, Hospital Puerta de Hierro, Madrid. \*\*\*\*Laboratorio de Oncogenética, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Universidade de Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brasil.

### Resumen

La alteración genética más frecuente en oligodendrogliomas es la pérdida conjunta de 1p/19q. Este evento ya acontece en etapas primarias del desarrollo de estos tumores. Es de gran valor clínico conocer si dichos tumores poseen esta delección ya que se ha correlacionado con un mejor pronóstico de los pacientes. Además de esta alteración, también se ha observado la delección de *CDKN2A* y *PTEN* y la amplificación de *EGFR*; estos cambios parecen asociarse a una mayor agresividad tumoral. Mediante la técnica de MLPA en una misma reacción podemos determinar si existe pérdida de 1p/19q y delecciones/amplificaciones de los genes anteriormente mencionados en el ADN procedente de muestras tumorales. En este trabajo hemos analizado 40 oligodendrogliomas y el kit MLPA P088 para determinar el estado alélico de 1p/19q, así como el kit MLPA P105 para observar la amplificación/delección de los genes *CDKN2A*, *PTEN*, *ERBB2*, *TP53* y *EGFR*. Mostraron pérdida de 1p el 45% de los tumores (18/40) y el 65% (26/40) de los oligodendrogliomas presentaron delección de las sondas que hibridan en las regiones de 19q. Para el kit MLPA P105, mostraron duplicación/delección de *EGFR* en el 7,5% (3/41) y 35% (14/40) de las muestras, respectivamente. El 60% de los casos (24/40) mostraron delección de *CDKN2* y ninguna muestra presentó duplicación de las sondas para este gen. El gen *ERBB2* se presentó duplicado en el 12,5% de los tumores (5/40) y un único tumor mostró pérdidas de dicho gen. El 30% (12/40) de las muestras presentó delección para *PTEN* y el 12,5% (5/40) mostró duplicación de dicho gen y, por último, 12,5% de los casos (5/40) presentaron duplicaciones de *TP53*. Estos resultados indican que la técnica de MLPA es idónea para la identificación de las alteraciones moleculares características de oligodendrogliomas. Estas alteraciones estarían contribuyendo a la formación del tumor, siendo la anomalía más significativa en oligodendrogliomas la

### pérdida de 1p/19q.

PALABRAS CLAVE: Oligodendrogliomas. Delección 1p/19q. MLPA. EGFR. CDKN2A. PTEN.

### Identification of genetic alterations by multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis in oligodendrogliomas

#### Summary

Concurrent deletion at 1p/19q is a common signature of oligodendrogliomas, and it may be identified in low-grade tumours (grade II) suggesting it represents an early event in the development of these brain neoplasms. Additional non-random changes primarily involve *CDKN2A*, *PTEN* and *EGFR*. Identification of all of these genetic changes has become an additional parameter in the evaluation of the clinical patients'

*Abreviaturas.* ADN: ácido desoxirribonucleico. GAC1: repeticiones ricas en leucina del componente neuronal 2. CAMTA1: activador de la transcripción de la calmodulina. CDK4: quinasa 4 dependiente de ciclina. CDKN2A: Inhibidor de la kinasa 2A dependiente de ciclina. CITED4: proteína de unión e interacción a CREB/p300. EGFR: receptor del factor del crecimiento epidérmico. EMP3: proteína epitelial de membrana 3. ERBB2: oncogen 2 homólogo del virus de la leucemia eritroblástica. ERCC1: la proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1. ERCC2: la proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 2. FISH: hibridación con fluorescencia in situ. GST: gen supresor de tumores. hRAD54: homólogo al gen reparador de ADN de *S. cerevisiae* RAD54. LOH: pérdida de heterocigosidad. MDM2: proteína de unión a p53. MGMT: 0-6 metilguanina ADN metiltransferasa. MLPA: amplificación múltiple de sondas dependiente de ligasa. OMS: Organización Mundial de la Salud. PTEN: homólogo de la fosfatasa y tensina. p14<sup>arf</sup>: inhibidor de la kinasa 2B dependiente de ciclina. p16<sup>ink4a</sup>: inhibidor de la kinasa 2A dependiente de ciclina. TP53: proteína tumoral p53. TP73: proteína tumoral p73. XRCC1: enzima de reparación XRCC1.

Recibido: 12-09-08. Aceptado: 12-10-08

**prognosis, including good response to conventional chemotherapy. Multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis is a new methodology that allows an easy identification of the oligodendrogliomas' abnormalities in a single step. No need of the respective constitutional DNA from each patient is another advantage of this method. We used MLPA kits P088 and P105 to determine the molecular characteristics of a series of 40 oligodendrogliomas. Deletions at 1 p and 19q were identified in 45% and 65% of cases, respectively. Alterations of *EGFR*, *CDKN2A*, *ERBB2*, *PTEN* and *TP53* were also identified in variable frequencies among 7% to 35% of tumours. These findings demonstrate that MLPA is a reliable technique to the detection of molecular genetic changes in oligodendrogliomas.**

KEY WORDS: Oligodendrogliomas. 1p/19q deletion. MLPA. EGFR. CDKN2A. PTEN.

### Introducción

Los oligodendrogliomas representan aproximadamente el 4-7% de todos los gliomas intracraneales primarios y acontecen más frecuentemente en pacientes entre la 4 y 5 década de vida. Estos tumores pueden manifestarse con todo el componente tumoral oligodendroglial o bien de forma mixta, con componente astrocítico. Son considerados oligodendrogliomas puros cuando el componente oligodendroglial es mayor del 90%<sup>12</sup>. Según la OMS los oligodendrogliomas se clasifican en: oligodendrogliomas de grado II y oligodendroglioma anaplásico (grado III). este último es mucho más agresivo y se comporta como un glioma maligno. Cuando existe componente astrocítico el tumor se clasifica en oligoastrocitoma de grado II o en oligoastrocitoma anaplásico (grado III)<sup>12</sup>.

La alteración molecular más frecuente observada en los oligodendrogliomas es la pérdida conjunta de 1p/19q<sup>8,25</sup>. Esta alteración se produce como consecuencia de una translocación no recíproca, que origina un cromosoma derivado con regiones 1p/19q y otro cromosoma con las regiones 1q/19p<sup>19,21</sup>. Por mecanismos que todavía se desconocen, el cromosoma derivado con las regiones 1p/19q se pierde en la siguiente división celular. La consecuencia de la translocación es una deleción 1p y 19q; esta alteración se puede identificar con las correspondientes técnicas de biología molecular utilizadas en la actualidad.

Se postula que en estas regiones delecionadas existen genes supresores de tumores (GST) y/o genes de reparación de ADN, cuya inactivación sería crucial para la génesis de los tumores oligodendrogliales. En las formas de grado II de malignidad ya está presente esta deleción, indicando que se trata de cambios que acontecen en etapas tempranas en el desarrollo oligodendroglial.

Las pérdidas alélicas de 1p se observan entre el 70-85% de los oligodendrogliomas y entre el 20 y 30% en los astrocitomas. Parece ser que existen 3 regiones críticas en 1p: 1p32, 1p35.35 y 1p36.22-p36-31<sup>6,7,10</sup>. Uno de los alelos de los genes diana localizado en estas regiones estaría delecionado y el otro estaría sujeto a otras alteraciones moleculares como mutación y/o metilación que contribuirían a su completa inactivación.

La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica a través de dos vías: directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina. Es un mecanismo que impide la transcripción del gen que se encuentre hipermetilado. Esto provoca que genes involucrados en el mantenimiento y división celular no se puedan transcribir contribuyendo así a la formación del proceso neoplásico. En oligodendrogliomas se ha descrito la metilación de ciertos genes como mecanismo de inactivación génica dando lugar a la génesis del desarrollo neoplásico.

En 1p36.3 cabe destacar *TP73*, un gen que presenta alta homología con *TP53*, y cuyo promotor se encuentra hipermetilado en el 24%-39% de los oligodendrogliomas<sup>2,9</sup>. Este hallazgo corrobora la ausencia de mutaciones inactivantes del gen en estos tumores<sup>3</sup>. Otro de los genes con carácter GST es *hRAD54*, localizado en 1p32. Este gen pertenece a una familia que codifican proteínas de unión al ADN, implicadas en el plegamiento correcto de dicha molécula; no se han encontrado mutaciones inactivantes de este gen<sup>6</sup>. *CITED4* y *CAMTA1* localizados en 1p34.2 y 1p36 respectivamente, se encuentran en las zonas de 1p donde se produce la pérdida de material genético, por lo que estos genes podrían estar funcionando como GST donde su pérdida contribuiría al desarrollo tumoral. La implicación en el desarrollo de oligodendrogliomas de *CITED4* podría ser también, al igual que *TP73* por la hipermetilación de su promotor<sup>2,8</sup>. Por contra, no hay ningún trabajo en la literatura que relacione una hipermetilación del promotor de *CAMTA1* con el desarrollo tumoral, pero sí que existe una disminución de expresión de este gen en los tumores oligodendrogliales<sup>5</sup>.

La región crítica en el cromosoma 19 se restringe a 19q13.2-13.4, aquí se localizan varios genes entre los que cabe destacar: genes codificadores de enzimas de reparación de ADN, como son *ERCC1*, *ERCC2* y *XRCC1*, si bien no existen suficientes evidencias de su implicación específica como genes supresores de tumores. *EMP3* (proteína epitelial de membrana) está localizado en 19q13.3, que se sobre-expresa cuando queda retenido 19q13 y está implicado como GST en neuroblastomas y algunos tipos de glioma<sup>23</sup>.

Otra de las alteraciones observadas en oligodendrogliomas es la amplificación de oncogenes. Este tipo de cambios se ha asociado a mayores grados de malignidad

tumoral. Algunos de los oncogenes implicados en la formación de los oligodendrogliomas son: *EGFR*, *CDK4* (ciclina dependiente de la quinasa 4), *MDM2* (proteína de unión a p53), *GAC1* (cromosoma 1 amplificado en gliomas). Alonso y cols. observaron amplificación y copias extra de los genes *CDK4*, *MDM2* y *GAC1* en oligodendrogliomas de bajo grado, sugiriendo que algunos tumores de bajo grado podrían presentar un comportamiento más agresivo<sup>1</sup>. La amplificación de *EGFR* está asociada con los glioblastomas primarios, pero también se ha sugerido la posible implicación de este gen en los tumores con componente oligodendroglioma<sup>13,24</sup>.

Cuando el oligodendroglioma posee una mayor agresividad se ha observado que existen deleciones parciales o totales de las zonas 9p y 10q, regiones donde se localizan *CDKN2A* (en 9p21) y *PTEN* (en 10q23.3)<sup>16,29</sup>. Estos genes actúan como GST y están implicados en el desarrollo neoplásico. Son escasas las mutaciones que se han observado en este tipo de genes, pero sí se ha descrito hipermetilación a nivel del promotor, preferentemente en astrocitomas<sup>31</sup>. Uno de los alelos de estos genes estaría inactivado mediante la pérdida de esta región y el otro estaría sometido a cambios epigenéticos; de esta forma se perdería su funcionalidad. Otro de los genes potencialmente implicado en la formación de oligodendrogliomas es *MGMT*. Este gen se localiza en 10q23, y su promotor se encuentra frecuentemente hipermetilado en tumores oligodendrogliales<sup>2</sup>. Esta alteración está asociada a una mejor respuesta al tratamiento con agentes alquilantes preferentemente en glioblastomas, pero existen datos que indican una mejor respuesta al tratamiento también en oligodendrogliomas cuando existe hipermetilación del promotor de dicho gen<sup>11,15</sup>. Recientemente, el estado de metilación del promotor de *MGMT* ha sido aceptado como factor imprescindible para determinar el pronóstico de pacientes con glioblastoma<sup>17</sup>. Una amplia revisión de los aspectos clínicos, quirúrgicos, histológicos, moleculares, etc., de oligodendrogliomas ha sido descrita recientemente<sup>20</sup>.

Por tanto, existen diversas alteraciones genéticas y epigenéticas que podrían correlacionarse con agresividad/respuesta a la terapia. La identificación precisa de dichas variables se ha convertido en un aspecto crucial en el manejo de los pacientes con oligodendrogliomas.

En la actualidad existen técnicas de biología molecular que en menos de 24 horas permiten identificar si existe o no deleción de lp/19q; además estas técnicas también permiten visualizar la existencia de amplificación de oncogenes en este tipo de tumores<sup>14</sup>. Las técnicas utilizadas hasta ahora eran LOH, FISH, para determinar el estado alélico de las regiones de lp/19q, pero en la actualidad una nueva técnica denominada MLPA del inglés (*multiple ligase probe amplification*), permite que en una misma reacción se puedan identificar la pérdida o la ganancia de las zonas de

interés. La técnica de MLPA se basa en una primera reacción de unión-ligación de las sondas con la zona homóloga; sólo las sondas que hayan hibridado podrán ser ligadas, y una posterior amplificación si dichas sondas han hibridado, permitiéndonos detectar grandes amplificaciones y deleciones. Con el MLPA kit P088 fueron analizados 40 oligodendrogliomas para comprobar la deleción de lp/19q. Para la identificación de deleciones y/o duplicaciones de *EGFR*, *CDKN2A*, *TP53*, *PTEN* y *ERBB2* se utilizó el MLPA kit P105. La combinación de ambos (MLPA kit p088 y MLPA kit p105) aumenta más la identificación precisa de las alteraciones moleculares con repercusión en el comportamiento clínico del oligodendroglioma.

### Material y métodos

Se utilizaron 40 muestras de oligodendrogliomas congeladas en nitrógeno líquido y 5 controles procedentes de ADN de sangre periférica de individuos sanos. El diagnóstico de los tumores se realizó histológicamente de acuerdo con la clasificación de la O.M.S.: 6 oligoastrocitomas (grado II-III), 13 oligodendrogliomas anaplásicos (grado III) y 21 oligodendrogliomas (grado II). Se purificó el ADN de las muestras tumorales utilizando el kit de Wizard Genomic DNA purification kit (Promega). Para el análisis por MLPA se utilizaron 100 ng de ADN de la muestra tumoral y de la muestra control. La desnaturalización del ADN y la hibridación posterior de las sondas es seguida por una reacción de ligación y una posterior amplificación por PCR.

Para el análisis de las regiones lp y 19q se utilizó el kit P088 MRC-Holland (Ámsterdam N.L.). Este kit MLPA P088 contiene 15 sondas que hibridan en regiones de lp, ocho sondas que hibridan en regiones de 19q y 20 sondas como controles internos específicas de otras regiones cromosómicas. También se utilizó el kit MLPA P105 MRC-Holland (Ámsterdam N.L.) que contiene dos sondas que hibridan en el gen *ERBB2*, nueve sondas que se unen en la región que codifica a *PTEN*, cinco sondas flanquean *CDKN2A*, ocho a *TP53*, tres a *EGFR* y 15 sondas que son controles internos que hibridan en otras regiones del genoma.

Tras una primera desnaturalización de la muestra durante 5 min. a 95°C se añaden las sondas y se dejan durante 16 horas a 60°C. Posteriormente se añade una ligasa termoestable con sus respectivos tampones durante 15 a 54°C y un calentamiento posterior a 98°C durante 5 min. Aquellas sondas que hayan hibridado, la ligasa las unirá. Por el contrario, si existe deleción, las sondas no hibridarán, no produciéndose la posterior ligación. Tras la ligación se añade una polimerasa para amplificar el producto y así poder detectarlo. Las condiciones de amplificación son: 35 ciclos durante 30 sec. a 95°C, 30 sec. a 60°C y 60 sec. a 72°C. Para finalizar se efectúa una incubación

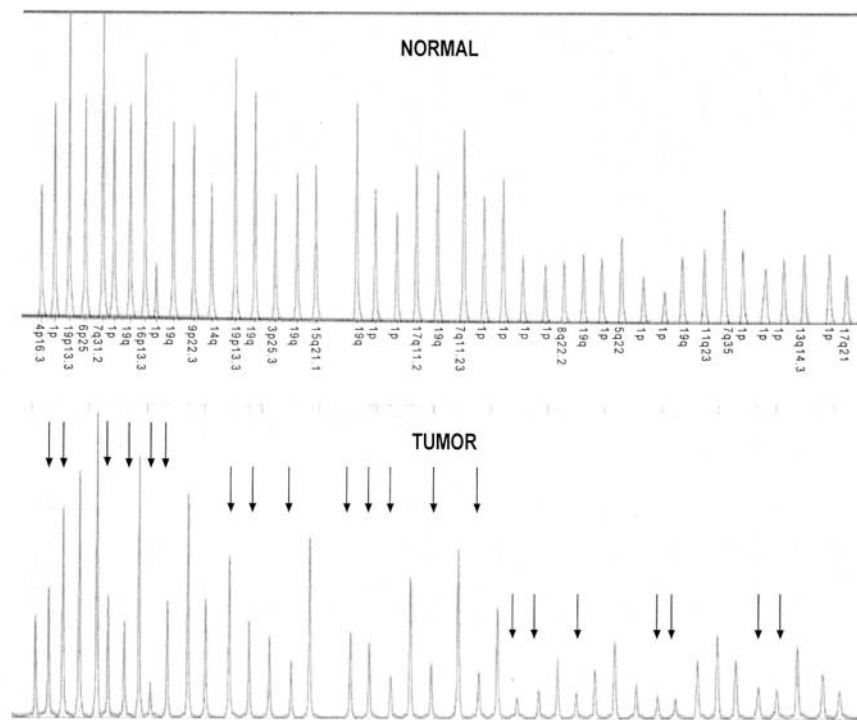


Figura 1. Electroferograma indicando el estado alélico de las regiones de 1p y 19q de una muestra normal y un oligodendroglioma de grado II. Las flechas nos indican pérdida de material genético en esa región.

durante 20 min. a 72°C y un enfriamiento a 4°C.

Posteriormente a la amplificación 1 µl del producto es analizado utilizando el secuenciador ABI 3.100 Avant (Applied Biosystem). El análisis de los datos se realizó con el programa MRC Coffalyser versión 2.0. Se realizó una intranormalización con las sondas control para cada muestra; posteriormente cada muestra tumoral se normaliza con las 5 muestras control. La disminución progresiva de señal de las sondas control de cada muestra en el secuenciador automático se corrigió por regresión simple. Los límites relativos normales se establecieron entre 0.75 y 1.30. Las sondas que mostraban un valor por debajo de 0,75 se consideraron que existía una delección y las sondas por encima de 1.30 una duplicación. Para el análisis estadístico de los MLPA se utilizó el programa Coffalyser versión 2.0.

**Resultados**

Los resultados obtenidos con el kit MLPA P088, específico para las regiones 1p/19q fueron los siguientes: mostraron pérdida de 1p el 45 % de los tumores (18/40) y en el 65% (26/40) de las muestras se observaron pérdidas de sondas que hibridaban con la región 19q. Todos los casos que presentaron pérdida de 1p mostraron conjuntamente pérdida de 19q. La figura 1 representa un electroferograma que muestra las sondas que hibridan con las regiones 1p y 19q. La interpretación de la figura es la siguiente: cuando la altura de la sonda de la muestra tumoral es la mitad que

la de la muestra control se ha producido una pérdida de la región donde hibrida la sonda. Si no existe pico de la altura, la delección abarca a ambos alelos (delección en homocigosis) por el contrario si el tamaño del área de la sonda de la muestra tumoral es el mismo que la muestra normal, no existe pérdida de la región.

Para el kit MLPA P105, que contiene sondas que hibridan en *EGFR*, *CDKN2A*, *ERBB2*, *TP53* y *PTEN*, los resultados obtenidos fueron los siguientes: mostraron duplicación de *EGFR* el 7,5% (3/41) de las muestras y el 35% (14/40) presentaron delección de dicho gen. El 60% de los casos (24/40) mostraron delección de *CDKN2A* y ninguna muestra presentó duplicación de las sondas para este gen. El 12,5% de los tumores (5/40) mostraron duplicación de *ERBB2* y el 2,5% (1/40) presentó delección. Para el gen *TP53* el 12,5% (5/40) presentaron duplicación y ninguna muestra presentó delección para este gen. Por último los resultados obtenidos con las sondas que hibridan en *PTEN* fueron: 30% (12/40) de las muestras presentó delección y el 12,5% (5/40) mostró duplicación de dicho gen.

La figura 2 muestra las delecciones y duplicaciones de los genes analizados con el kit MLPA P105.

**Discusión**

La alteración molecular más frecuente que se observa en los oligodendrogliomas es la pérdida de 1p/19q, que ya se muestra en tipos tumorales de grado II. por lo que



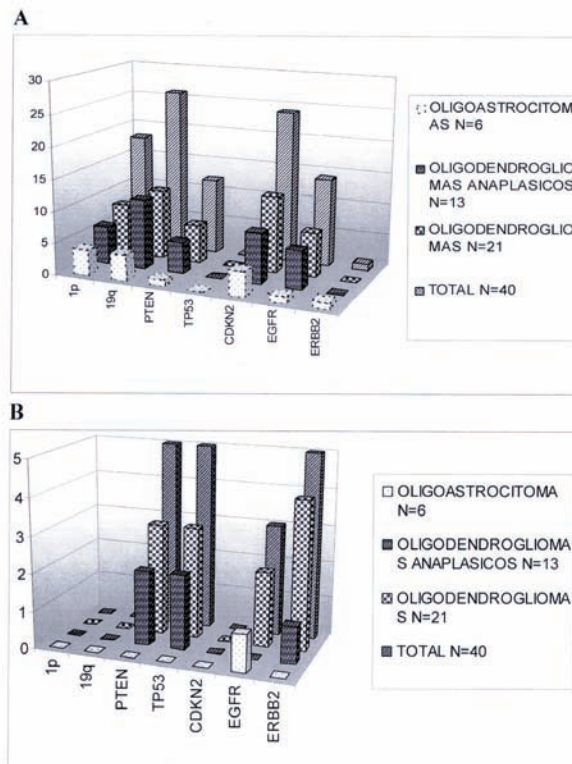


Figura 2. Deleciones (A) y duplicaciones (B) detectadas con la técnica MLPA utilizando las SALSAS P088 y P105 en una serie de 40 oligodendrogliomas.

sería una alteración temprana en la génesis del tumor. Nuestros datos vienen a confirmar ambos hechos, ya que hemos identificado la pérdida de estas regiones mostrando un 45% (1p) y un 65% (19q) en la serie de tumores analizada. Todas las muestras que tenían pérdida de 1p también contenían deleción de 19q, lo que viene a corroborar que normalmente estas dos alteraciones se presentan en forma conjunta.

Se observó que 3 de las 40 muestras presentaban amplificación de *EGFR*. Este oncogen se localiza en 7p12 y su amplificación se ha descrito en varios tipos de cáncer asociándose a una mayor agresividad tumoral<sup>18</sup>. Nuestros resultados mostraron que la amplificación estaba presente en un oligodendroglioma de grado II, un oligodendroglioma de grado III, y un oligoastrocitoma. Probablemente este tipo de tumores menos agresivos que presentan amplificación de *EGFR* puedan evolucionar hacia un mayor grado de malignidad, o demostrar una mayor agresividad biológica.

En un estudio previo, mediante la técnica de PCR a tiempo real pusimos de manifiesto amplificaciones y ganancias de dosis génica de *EGFR* en oligodendrogliomas<sup>13</sup>, en cambio el MLPA, sólo fue capaz de detectar la amplificación de *EGFR* en aquellas muestras que presentaban un elevado número de dosis génica equivalente a más de 100

copias del gen mediante PCR a tiempo real, coincidiendo con las 3 muestras donde encontramos amplificación mediante MLPA<sup>13</sup>. Podemos concluir que la PCR a tiempo real es una técnica mucho más sensible que los MLPA para detectar ganancia de dosis, aunque mucho más ardua. Por lo tanto la técnica de MLPA quedaría restringida a la identificación de grandes deleciones y duplicaciones/amplificaciones. Dado que la inestabilidad cromosómica es una característica propia de los tumores, se suele producir en muchos de ellos pérdidas o ganancias de los diferentes cromosomas y una de las formas de rápida detección de estas alteraciones sería la metodología de MLPA.

En otros tipos de tumores gliales (astrocitomas), se ha observado pérdida de alelos del cromosoma 7, lugar donde se localiza *EGFR*<sup>3</sup>. En nuestra serie se ha observado que el 35% de los oligodendrogliomas también presentaban pérdidas de *EGFR*; ello pone de manifiesto que podría existir, en base a los resultados obtenidos, pérdida alélicas del cromosoma 7 en estos tumores. Con frecuencia estas pérdidas alélicas no se corresponden necesariamente con la amplificación truncada de *EGFR*, de acuerdo a lo descrito en gliomas astrocíticos<sup>4</sup>.

En oligodendrogliomas de alto grado se ha descrito que puede existir pérdida de 9p21, región donde se localiza *CDKN2A*<sup>16</sup>. Este gen codifica a dos proteínas supresoras tumorales como son *p16<sup>ink4a</sup>* y *p14<sup>ARF</sup>*. Dado el papel clave que desempeña *CDKN2A* en el control del ciclo celular, la pérdida de función de dicho gen podría desempeñar un factor clave en el desarrollo de oligodendrogliomas. Aunque no se han descrito mutaciones de *CDKN2A*, en estos tumores parece ser que la deleción junto a la metilación aberrante de su promotor son los mecanismos que conllevan a la inactivación total de este gen supresor de tumores<sup>30</sup>. En nuestra serie tumoral se observa que el 60% de muestras presentaban pérdida del gen. La deleción de este gen con carácter oncosupresor podría estar contribuyendo al desarrollo del oligodendroglioma así como a un aumento de la malignidad o agresividad tumoral<sup>16</sup>.

La amplificación del oncogen *ERBB2* esta asociada con el desarrollo de muchos tipos de neoplasias, como puede ser mama, hígado... etc<sup>18</sup>. Este gen codifica una proteína-kinasa implicada en la división celular. Cuando el gen se encuentra amplificado existen niveles anormales de proteína y la célula comienza a dividirse descontroladamente. Nuestra serie mostró que el 12.5% de los tumores presentaron duplicación de este gen, y sólo un oligoastrocitoma mostró pérdida. Es posible que la amplificación de este oncogen también pueda influir en el desarrollo de los oligodendrogliomas adquiriendo el tumor un mayor grado de malignidad como se ha descrito en otros tipos de tumores, aunque la sobredosis de *ERBB2* en gliomas suele ser escasa<sup>18</sup>.

Mutaciones en *TP53* están asociadas con muchos tipos

tumorales, incluyendo astrocitomas<sup>24</sup>. La función de este gen es llevar a la célula a apoptosis cuando posee daños en el material genético. Si el gen no es funcionante la célula comienza a acumular mutaciones y a descontrolarse pudiendo originar un tumor. Cuando se analizó este gen mediante MLPA, el 12,5% de los tumores presentaban copias extra de *TP53*. Las poliploidias son frecuentes en estos tipos tumorales y es posible que la técnica esté detectando una poliploidía de la región 17q13.1, donde se localiza este gen<sup>26</sup>.

El 30 % de las muestras analizadas presentaron delección en *PTEN*, localizado en 10q 23. La pérdida del cromosoma 10 en gliomas está relacionada con un mayor aumento de malignidad<sup>27</sup>, y parece estar asociada a la progresión desde astrocitoma anaplásico hasta glioblastoma secundario. Nuestros resultados muestran delecciones de *PTEN* en todos los grados tumorales que hemos analizado, por lo que es posible que aquellos tumores de grado II que presenten delecciones en *PTEN* vayan a recaer o a aumentar su grado de malignidad. La pérdida de funcionalidad de *PTEN* en gliomas no está asociada a mutaciones, sino a la metilación aberrante del promotor y/o delecciones de esa región o de todo el cromosoma<sup>24</sup>.

Teniendo en cuenta que la pérdida de 1p/19q en oligodendrogliomas está asociada con una mejor respuesta a la quimioterapia y un mayor índice de supervivencia, sería de gran ayuda que en el momento de la obtención del tumor se procediera a determinar si dicho tumor presenta pérdidas de estas regiones para observar la evolución del paciente. La técnica de MLPA, es una metodología muy sencilla y en escasas horas se puede obtener la información a nivel molecular de las alteraciones con capacidad predictiva del comportamiento del oligodendroglioma.

Las técnicas actuales de biología molecular cada vez son más sensibles y precisas, esto supone que en un futuro los laboratorios las apliquen de continuo para determinar la evolución y el comportamiento genético del tumor, como complemento de las técnicas que actualmente se utilizan.

La finalidad de este trabajo ha sido, por tanto, la introducción de una nueva técnica, MLPA, para determinar un perfil genético del tumor. La ventaja de esta técnica con respecto a las que actualmente se utilizan (LOH, FISH) para detectar este tipo de alteraciones son: rapidez, la prescindibilidad de ADN constitucional y la capacidad de detección de alteraciones moleculares cuando solo existe el 50% de las células que poseen aberraciones genéticas<sup>22</sup>.

En un futuro se espera que se establezca un perfil tumoral genético personalizado para cada paciente. De esa forma se puede emplear el fármaco más adecuado dependiendo de las alteraciones moleculares que aparecen en ese tumor, realizando un tratamiento quimioterápico mucho más dirigido y especializado en función de las aberraciones genéticas que posea dicho tumor.

## Agradecimientos

Financiado con el proyecto FIS P105/0829

## Bibliografía

1. Alonso, M.E., Bello, M.J., Arjona, D., et al.: Real-time quantitative PCR analysis of gene dosages reveals gene amplification in low-grade oligodendrogliomas. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 900-906.
2. Alonso, M.E., Bello, M.J., Gonzalez-Gomez, P., et al.: Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 144: 134-142.
3. Alonso, M.E., Bello, M.J., Gonzalez-Gomez, P., et al.: Mutation analysis of the p73 gene in nonastrocytic brain tumors. *Br J Cancer* 2001; 85: 204-208.
4. Arjona, D., Bello, M.J., Rev, J.A.: EGFR intragenic loss and gene amplification in astrocytic gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 164: 39-43.
5. Barbashina, V., Salazar, P., Holland, L.C., Rosenblum, M.K., Ladanyi, M.: Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification. definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1119-1128.
6. Bello, M.J., de Campos, J.M., Vaquero, J., et al.: hRAD54 gene and 1 p high-resolution deletion-mapping analyses in oligodendrogliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 116: 142-147.
7. Bello, M.J., Leone, P.E., Nebreda, P., et al.: Allelic status of chromosome 1 in neoplasms of the nervous system. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 83: 160-164.
8. Bello, M.J., Leone, P.E., Vaquero, J., et al.: Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 1995; 64: 207-210.
9. Dong, S., Pang, J.C., Hu, J., Zhou, L.F., Ng, H.K.: Transcriptional inactivation of TP73 expression in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 2002; 98: 370-375.
10. Dong, Z., Pang, J.S., Ng, M.H., Poon, W.S., Zhou, L., Ng, H.K.: Identification of two contiguous minimally deleted regions on chromosome 1p36.31-p36.32 in oligodendroglial tumours. *Br J Cancer* 2004; 91: 1105-1111.
11. Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, F., et al.: Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343: 1350-1354.
12. Figarella-Branger, D., Colin, C., Coulibaly, B., et al.: Histological and molecular classification of gliomas. *Rev Neurol* 2008; 164: 505-515.
13. Franco-Hernandez, C., Martinez-Glez, V., Alonso, M.E., et al.: Gene dosage and mutational analyses of EGFR in

oligodendrogliomas. *Int J Oncol* 2007; 30: 209-215.

14. Gil-Salu, J.L., Nieto, A., Rodríguez-Gutierrez, J.F., Almarcha, J.: Allelic loss at 1p/19q analysis in brain tumors of glial lineage. *Neurocirugía* 2007; 18: 285-293.

15. Glass, J., Hochberg, F.H., Gruber, M.L., Louis, D.N., Smith, D., Rattner, B.: The treatment of oligodendrogliomas and mixed oligodendroglioma-astrocytomas with PCV chemotherapy. *J Neurosurg* 1992; 76: 741-745.

16. Godfraind, C., Rousseau, E., Ruchoux, M.M., Scavilli, F., Vikkula, M.: Tumour necrosis and microvascular proliferation are associated with 9p deletion and CDKN2A alterations in 1p/19q-deleted oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003; 29: 462-471.

17. Gorlia, T., van den Bent, M.J., Hegi, M.E., et al.: Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastomas: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *The Lancet Neurology* 2008; 9: 29-38.

18. Grandal, M.V., Madhus, I.H.: Epidermal Growth Factor Receptor and Cancer: Control of Oncogenic Signalling by Endocytosis. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1527-1534.

19. Griffin, C.A., Burger, P., Morsberger, L., et al.: Identification of der(1;19)(q10;p10) in live oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 988-994.

20. Grupo de Neurooncología de la Sociedad Española de Neurocirugía.: Oligodendroglioma. 2008 Publicaciones Permanyer.

21. Jenkins, R.B., Blair, H., Ballman, K.V., et al.: A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 2006; 66: 9852-9861.

22. Jeuken, J., Cornelissen, S., Boots-Sprenger, S., Gijzen, S., Wesseling, P.: Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in filial tumors. *J Mol Diagn* 2006; 8: 433-443.

23. Li, K.K., Pang, J.C., Chung, N.Y., et al.: EMP3 overexpression is associated with oligodendroglial tumors retaining chromosome arms 1p and 19q. *Int J Cancer* 2007; 120: 947-950.

24. Ohgaki, H., Kleihues, P.: Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007; 170: 1445-

1453.

25. Reifenberger, J., Reifenberger, G., Liu, L., James, C.D., Wechsler, W., Collins, V.P.: Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994; 145: 1175-1190.

26. Rey, J.A., Bello, M.J., de Campos, J.M., Kusak, M.E., Moreno, S.: Chromosomal composition of a series of 22 human low-grade gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 29: 223-237.

27. Sasaki, H., Zlatescu, M.C., Betensky, R.A., Ino, Y., Cairncross, J.G., Louis, D.N.: PTEN is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and PTEN alterations are associated with poor prognosis. *Am J Pathol* 2001; 159: 359-367.

28. Tews, B., Roerig, P., Hartmann, C., et al.: Hypermethylation and transcriptional downregulation of the CITED4 gene at 1p34.2 in oligodendroglial tumours with allelic losses on 1p and 19q. *Oncogene* 2007; 26: 5010-5016.

29. Trost, D., Ehrler, M., Fimmers, R., et al.: Identification of genomic aberrations associated with shorter overall survival in patients with oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 2007; 120: 2368-2376.

30. Wolter, M., Reifenberger, J., Blaschke, B., et al.: Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 1170-1180.

31. Yu, J., Zhang, H., Gu, J., et al.: Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. *BMC Cancer* 2004; 4: 65.

---

Franco-Hernandez, C.; Martínez-Glez, V.; Torres-Martín, M.; de Campos, J.M.; Isla, A.; Vaquero, J.; Casartelli, C.; Rey, J.A.: Identificación de alteraciones genéticas en oligodendrogliomas mediante amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (MLPA) (multiple ligation-dependent probe amplification). *Neurocirugía* 2009; 20: 117-123.

---

*Correspondencia postal:* Juan A. Rey. Unidad de Investigación. Hospital Universitario La Paz. Paseo Castellana 261.28046 Madrid. *Electrónica:* jarey.hulp@salud.madrid.org