

Detección de mutaciones y deleciones homocigóticas del gen PTEN en astrocitomas pediátricos y tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET)

PTENeko genearen mutazio eta homozigoto delekzioen ikerketa haurren astrozitometan eta neuroektodermiko primitibo diren tumoreetan

J. Muñoz¹, M. del Mar Inda¹, X. Fan¹, J.J. Burgos², J.M. Rivera², T. Tuñón³, J.M. Martínez-Peñuela³, I. de Prada⁴, I. González-Mediero⁴, J. Sáez Castresana¹

¹Departamento de Genética, Universidad de Navarra, Pamplona.

²Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de Cruces, Baracaldo.

³Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Navarra, Pamplona.

⁴Servicio de Anatomía Patológica, Hospital del Niño Jesús, Madrid.

Correspondencia: Sáez Castresana, Departamento de Genética, Universidad de Navarra, Irunlarrea s/n, 31008 Pamplona.

E-mail: jscastresana@unav.es

RESUMEN

El gen PTEN es un gen supresor de tumores recientemente descubierto, cuyo locus se encuentra en el cromosoma 10q23. Participa en el desarrollo de varios tipos de cáncer humano, entre ellos tumores cerebrales. Pero no ha sido aún estudiado en tumores cerebrales pediátricos. En este trabajo presentamos el estudio de mutaciones de PTEN en 32 astrocitomas pediátricos de bajo grado y 2 anaplásicos, así como el estudio de deleciones homocigóticas del mismo gen en 34 casos de tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET), correspondiendo 11 a PNET supratentoriales (neuroblastomas cerebrales) y 23 a PNET infratentoriales (meduloblastomas). Los resultados preliminares de este trabajo muestran que PTEN no sufre mutaciones en astrocitomas pediátricos de bajo grado. Se muestra además la estrategia de puesta a punto de la técnica de PCR diferencial para detección de deleciones homocigóticas del gen PTEN.

PALABRAS CLAVE

Astrocitomas pediátricos; PNET; Meduloblastoma; PTEN; PCR-SSCP; PCR diferencial; Mutación; Deleción homocigótica

LABURPENA

PTEN genea orain dela gutxi deskubritutako tumore-ezabatzailea da, locus-a 10q23 kromosoman du. Giza minbizi zenbaiten garapenean hartzen du parte, tartean garuneko tumoreenean. Ez da aztertu garuneko tumore pediatrikoetan. Lan honetan aurkeztzen dugu PTENaren mutazioen azterketa gradu baxuko 32 astrozitoma pediatriko eta 2 anaplasikoetan, baita ere gene beraren delezio homozigotikoen azterketa tumore neuroektodermiko primitiboan (PNETs) 32 kasutan, hauetako 11 PNETs supratentorialak (garuneko neuroblastomak) eta 23 PNETs infratentorialak (meduloblastomak). Lan honen aurreneko emaitzek erakusten dute PTENak ez duela mutaziorik gradu baxuko astrozitoma pediatrikoetan. Erakusten ere du PTENaren

delezio homozigotikoak detektatzeko PCR diferencial teknika doitzeko estrategia.

FUNTSEZKO HITZAK

Astrozitoma pediatrikoak; PNETs; Meduloblastoma; PTEN; PCR-SSCP; PCR diferencial; Mutazioa; Delezio homozigotikoa.

ABSTRACT

PTEN is a recently discovered tumor suppressor gene, whose locus is at chromosome 10q23. PTEN participates in the development of human tumors, like brain supratentorial (neuroblastomas cerebrales) tumors. But the role of PTEN in pediatric brain tumors has not been assessed. Here we present the study of PTEN mutations in 32 low grade pediatric astrocytomas and 2 anaplastic astrocytomas, together with the study of PTEN homozygous deletions in 34 cases of primitive neuroectodermal tumors (PNETs), 11 of which correspond to supratentorial PNETs (cerebral neuroblastomas), and 23 to infratentorial PNETs (meduloblastomas). The preliminary results of this work show that PTEN do not suffer mutations in low grade pediatric astrocytomas. The strategy to set up the differential PCR technique for the detection of PTEN homozygous deletions is also shown.

KEY WORDS

Pediatric astrocytomas; PNETs; Meduloblastoma; PTEN; PCR-SSCP; Differential PCR; Mutation; Homozygous deletion.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los tumores pediátricos, los del sistema nervioso central (SNC) constituyen el segundo grupo más frecuente. Cada año se registran en España unos 1.500 casos nuevos de cáncer en niños menores de 15 años, y de ellos, aproximadamente, casi el 25% corresponden a tumores cere-

brales. Entre ellos, a nivel de grupo, son los astrocitomas los que presentan una mayor frecuencia (más del 60%), mientras que si precisamos cuál es el tumor cerebral maligno más frecuente en la infancia, hemos de destacar al meduloblastoma, con una frecuencia media del 15% de los tumores intracraneales. Los dos grupos de tumores cerebrales pediátricos que se estudiarán a nivel molecular en este proyecto (astrocitomas y meduloblastomas/PNET) constituyen, por tanto, alrededor del 75% de todos los tumores cerebrales infantiles, incluyendo astrocitomas supratentoriales de bajo (15-25%) y alto (10-15%) grado, astrocitomas de cerebelo (10-20%), gliomas de tronco cerebral (10-20%), meduloblastomas (10-20%), y tumores neuroectodémicos primitivos supratentoriales (PNET) (2-3%).

Desde el punto de vista morfológico, los astrocitomas pediátricos se clasifican en⁽¹⁾:

- Astrocitoma pilocítico, astrocitoma grado I según la OMS;
- Astrocitoma difuso, astrocitoma grado II según la OMS: muestra un discreto grado de atipia nuclear;
- Astrocitoma anaplásico, astrocitoma grado III según la OMS: muestra atipia nuclear y aumento de la actividad mitótica;
- Glioblastoma multiforme, astrocitoma grado IV según la OMS: muestra las características de los astrocitomas grado III y, además, proliferación vascular y necrosis.

Comúnmente se designa como astrocitomas de bajo grado a los astrocitomas grados I y II, mientras que los grados III y IV constituyen el grupo de los astrocitomas de alto grado. Comparativamente, en adultos, apenas existen los astrocitomas pilocíticos, siendo el glioblastoma multiforme el tipo más frecuente de astrocitoma. Sin embargo, dentro de los astrocitomas pediátricos la frecuencia se presenta a la inversa: son los astrocitomas pilocíticos los más fre-

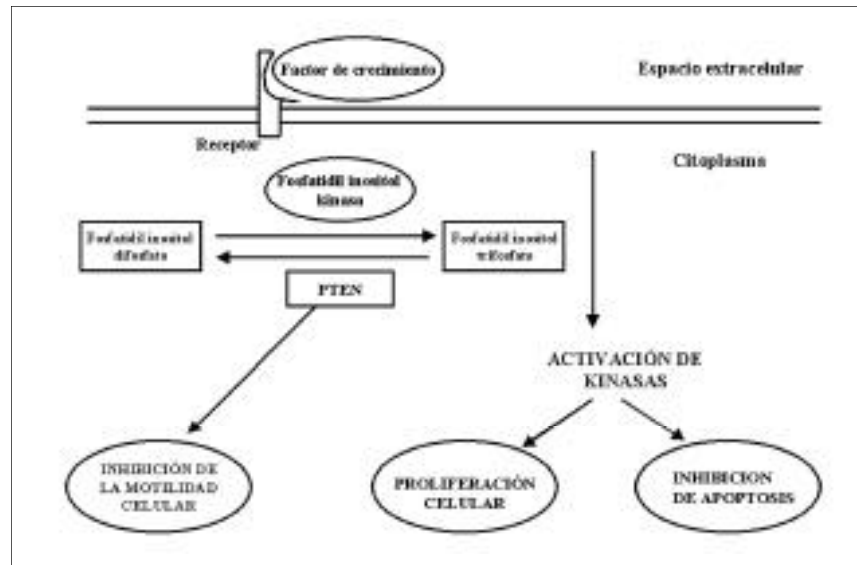


Figura 1: Funciones de PTEN en el control de la proliferación celular, la apoptosis y la motilidad celular. PTEN juega un papel regulador, junto a la fosfatidil inositol 3-quinasa, en la proliferación y la apoptosis. Si PTEN sufre mutaciones o delecciones homocigóticas, se producirá fosfatidil inositol trifosfato en abundancia, y se activarán diversas quinasas que conducirán a un aumento de la proliferación celular, junto a la inhibición de la apoptosis, y, por ello, al desarrollo de tumores. El daño genético de PTEN puede favorecer también la motilidad celular y, probablemente, el desarrollo de metástasis.

cuentes, siendo relativamente infrecuente el grupo de astrocitomas de alto grado.

Respecto a los PNET, cabe destacar que, a nivel del SNC, se presentan en dos localizaciones: supratentorial e infratentorial, siendo esta última más frecuente. Los PNET infratentoriales que se originan en el cerebelo son denominados meduloblastomas. Los PNET supratentoriales pueden originarse en la glándula pineal (pineoblastomas), o en los hemisferios cerebrales (neuroblastomas cerebrales), presentándose en este caso como grandes masas tumorales. Aunque los PNET supra e infratentoriales son similares histológicamente, el pronóstico es diferente.

En 1997, dos grupos de investigación, del Columbia University Cancer Center y del MD Anderson Cancer Center identificaron un nuevo gen supresor de tumores: PTEN/MMAC1 (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome ten / mutated in multiple advanced cancers 1)^(2,3), cuya inactivación puede producir progresión maligna en tumores de mama, próstata

y cerebro. Un poco más tarde otro grupo de la Universidad de Yale identificó el mismo gen al buscar fosfatasa de doble especificidad, denominándolo TEP-1 (TGF- β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1)⁽⁴⁾. El gen PTEN se localiza en el locus cromosómico 10q23. Su cDNA codifica una proteína de 403 aminoácidos y 47 KD.

PTEN es una fosfatasa lipídica y actúa sobre su diana, el PIP3 (fosfatidil-inositol-trifosfato). PIP3 es un mensajero interno para ciertos estimuladores del crecimiento celular. La unión de estas moléculas a sus receptores de la membrana celular activa una enzima que genera PIP3 mediante la adición de un tercer fosfato a su predecesor, PIP2. PIP3 activa otras cinasas, y éstas hacen que la célula entre en el ciclo celular progresando en él, e impidiéndose la iniciación del programa de apoptosis. PTEN, como fosfatasa que es, puede retirar el fosfato de PIP3, parándose, así, la señal de crecimiento celular⁽⁵⁾. PTEN contribuye también, mediante un mecanismo diferente, a la inhibición de la motilidad celular (Figura 1).

Varios grupos de investigación han investigado la frecuencia de mutaciones de PTEN en gliomas. Tales estudios muestran que PTEN sufre mutaciones/deleciones en un 44%, 28% o 27% de los glioblastomas⁽⁶⁻⁸⁾. Parece que PTEN está mutado sólo en los gliomas de alto grado (grado III, astrocitomas anaplásicos; grado IV, glioblastomas). Posteriormente, Tohma y cols. demostraron que la frecuencia de mutaciones de PTEN en glioblastomas que se desarrollaban clínicamente *de novo* era mayor que en los glioblastomas secundarios que se formaban por a partir de astrocitomas grados II o III⁽⁹⁾. Más aún, Rasheed y cols.⁽¹⁰⁾ demostraron que las mutaciones de PTEN se daban más frecuentemente en glioblastomas de adultos, pero no en gliomas de bajo grado de adultos o en gliomas infantiles. Estos datos sugieren que las mutaciones de PTEN constituyen una alteración importante en el desarrollo de gliomas, pudiendo constituir un paso molecular necesario en la transformación de gliomas de bajo a alto grado. Sin embargo, PTEN no se ha estudiado a modo comparativo entre astrocitomas pediátricos de alto y bajo grado. El estudio de PTEN puede utilizarse como prueba diagnóstica, para contribuir a la definición del grado de malignidad de los gliomas. Nuestro estudio pretende demostrar si el gen PTEN participa en la génesis de astrocitomas pediátricos y PNET.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

El material sometido a estudio consiste en DNA genómico extraído a partir de secciones de parafina obtenidas de los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital de Cruces, Hospital de Navarra y Hospital del Niño Jesús. En concreto se ha logrado extraer cantidad suficiente de DNA para estudio, en un total de 32 astrocitomas pe-

diátricos de bajo grado (I y II), 2 astrocitomas anaplásicos (grado III), y 34 PNETs (11 supratentoriales y 23 infratentoriales). Se espera, en breve, recibir una nueva colección de 21 astrocitomas pilocíticos (grado I), así como un número no determinado aún de astrocitomas de alto grado (III y IV) que puedan servir para llegar a conclusiones efectivas sobre la comparación de lesiones genéticas entre astrocitomas de bajo y alto grado. Asimismo, se recibirán más de 50 nuevos PNET. También se incluyó en el estudio el DNA extraído de sangre de 30 donantes sanos, utilizándose como control de normalidad (control negativo de lesión del gen PTEN).

Métodos

PCR-SSCP

El estudio de posibles mutaciones en el gen PTEN se llevó a cabo mediante PCR-SSCP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos en la conformación de cadenas sencillas)⁽¹¹⁾, de acuerdo a protocolos anteriormente desarrollados en nuestro laboratorio⁽¹²⁾. Es ésta una técnica sensible (se pueden detectar entre un 80 y un 90% de las mutaciones), rápida y fácil de desarrollar; no se precisa radiactividad para interpretar los resultados y, económicamente, es de bajo coste. La experimentación consta de varias fases:

- Realización de la técnica de PCR sobre el DNA genómico, gracias a lo cual se logra amplificar la cantidad de moléculas de DNA de partida (escasas) que se someterán a estudio. De no ser por la PCR, no se podría visualizar el DNA en geles posteriormente.
- Desnaturalización del DNA amplificado mediante formamida y calor (baño a 95°C durante 5 ó 10 min). De esta manera se logra separar la doble hélice de DNA, presentándose en forma de cadenas sencillas.

- Electroforesis del DNA en geles de acrilamida al 12-15%, dependiendo del tamaño del DNA amplificado. Durante este proceso se confía en que las cadenas sencillas de DNA se separen gracias al gel de acrilamida. En caso de existir una mutación (incluso un único cambio de un nucleótido por otro), la estructura secundaria de la cadena sencilla mutada difiere de la estructura secundaria de la cadena sencilla de tipo salvaje (no mutada). Debido a la diferente estructura secundaria adoptada por el DNA mutado frente al DNA de tipo salvaje, se produce, en el caso de la mutación, una migración en forma de bandas electroforéticas diferente al patrón de normalidad (no mutado).
- Tinción de plata, mediante la que se pueden visualizar las bandas de DNA con patrón normal, y aquéllas que muestran patrones diferentes (sospecha de mutación)⁽¹²⁾.
- Tras una sospecha de mutación, se secuencia esa región de DNA a fin de determinar si realmente se ha producido un cambio patológico, o si el cambio corresponde tan sólo a un polimorfismo (variante alélica poblacional, no patológica, causa de la diversidad genética).

El estudio se desarrolla escogiendo áreas genómicas de unos 200 pares de bases (pb) (Tabla I) correspondientes a exones del gen PTEN y las regiones próximas a los exones, pero que ya pertenecen a los intrones que los flanquean. Cuando un exón determinado posee más de 200 pb, se seleccionan varias áreas superpuestas dentro de él, de manera que no quede ninguna pequeña parte de la estructura del exón y las bases adyacentes del intrón, sin ser estudiada. La lista de oligonucleótidos, así como las condiciones óptimas para la realización de la PCR, utilizadas para amplificar cada una

de las regiones de interés del gen PTEN se muestra en la tabla I. El DNA extraído de las líneas celulares T98G, LN319 y U251 se ha utilizado como control positivo, pues es sabido que estas líneas contienen mutaciones en PTEN⁽¹³⁾.

PCR diferencial

Mediante la técnica de PCR diferencial⁽¹⁴⁾ se compara la banda producida en un gel de agarosa por una secuencia parcial de un gen problema (gen que supuestamente sufre amplificación -oncogén- o delección -gen oncosupresor-) tras la reacción de PCR en un termociclador, frente a la producida por otra secuencia de un gen comparativo que no sufre alteraciones en cáncer humano. En el caso de los genes oncosupresores, para que pierdan su función, han de sufrir delección los dos alelos, por lo que la técnica de PCR diferencial persigue detectar la posible presentación de delecciones homocigóticas en los genes oncosupresores. Según el protocolo utilizado, se realizó una reacción de PCR diferencial (contiene 4 oligonucleótidos), en la que dos oligonucleótidos amplifican el exón 6 del gen PTEN (Tabla I), y otros dos amplifican un fragmento de 160 pb del gen GAPDH. Los oligonucleótidos del gen GAPDH fueron los siguientes: 5'-AACGTGTCAGTGGTGGACCTG-3' y 5'-AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT-3'. Se utilizaron 30 ciclos de amplificación, 2,0 mM de Mg²⁺ y 57°C de temperatura de unión. Como control negativo se utilizó DNA extraído de sangre de 30 donantes sanos. Como control positivo se incluyó en el estudio el DNA extraído de la línea celular A172⁽¹³⁾, que presenta delección homocigótica de PTEN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mutaciones del gen PTEN

Hasta el momento, se ha realizado el es-

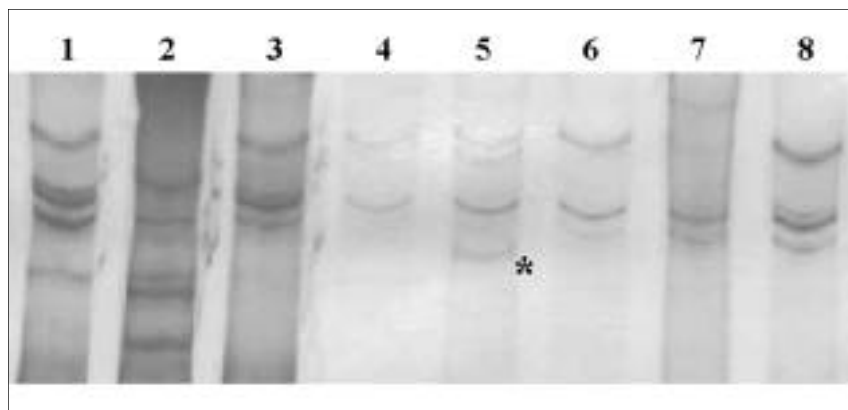


Fig. 2: Gel de acrilamida al 12% sobre el que se ha realizado una tinción de plata tras electroforesis mediante la técnica de SSCP para explorar el exón 1 del gen PTEN en cuanto a presencia o ausencia de mutaciones en astrocitomas pediátricos de bajo grado. 1 y 3: DNA extraído de sangre de donantes sanos (controles negativos); 2: DNA de la línea celular LN319, que contiene una mutación en el exón analizado (control positivo); 4-8: DNA de astrocitomas pediátricos de bajo grado. El número 5 podría presentar una mutación, ya que aparece una banda extra (*), diferente al patrón normal de bandas.

tudio de mutaciones en el grupo de los 32 astrocitomas de bajo grado, no habiéndose detectado ningún caso que presentara una posible mutación (Figura 2). No se ha podido comparar la frecuencia de mutaciones respecto a astrocitomas pediátricos de alto grado, aunque este es uno de los objetivos finales del estudio, que se llevará a cabo próximamente. Sin embargo, mediante métodos similares hemos estudiado 22 glioblastomas de adultos, lo cual puede servir, *a priori*, para establecer una comparación con astrocitomas de alto grado. El estudio de estos 22 glioblastomas reveló mutaciones de PTEN en 4 casos (18%).

Delecciones homocigóticas de PTEN

La técnica de PCR diferencial para detectar delecciones homocigóticas del gen PTEN se ha utilizado hasta el momento en el grupo de 34 PNET (Figura 3). No obstante, dados los resultados obtenidos, no podemos concluir sobre la posible participación de este gen en los PNET mediante delecciones homocigóticas. Hasta ahora nos hemos enfrentado a varios problemas con esta técnica:

- Cuando se pretende determinar delecciones homocigóticas, hay que contar

con un dato que puede arruinar los experimentos: el contenido de células normales que presentan los tumores sometidos a estudio. Esas células normales, en general, no poseen un DNA dañado, por lo que el gen PTEN de tales células no se encontrará delecionado. En tal caso, al realizar la reacción de PCR diferencial, PTEN puede mostrar una banda más o menos intensa en los geles de agarosa, dependiendo del porcentaje de células normales que se presenten en el tumor. Cuanto mayor sea el número de ciclos de PCR mayor será la intensidad de esa banda, que podrá llegar a igualarse en intensidad a la que presenta el segundo gen (gen comparativo, en este caso el gen de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, GAPDH). Por ello, hay que minimizar el número de ciclos hasta el punto en que se produzca banda de GAPDH y una banda, no perceptible apenas, de PTEN (los estudios más habituales dan como positivo el caso en que la intensidad de PTEN corresponda a un tercio o menos de la intensidad de GAPDH).

- Pero minimizar el número de ciclos de

TABLA I. SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AMPLIFICACIÓN DEL GEN PTEN

Exon	5'	3' 5'	3'
1	AGAAGAAGCCCCGCCACCAG/GAGGAGCAGCCGCAGAAATG		59 ^a /174 ^b
2	GTTTGATTGCTGCATATTTCA/TCTAAATGAAAACACAACATGAA		50/201
3	TGTTAATGGTGGCTTTTGT/GCAAGCATACAAATAAGAAAAC		53/113
4	TTCCTAAGTGCAAAAGATAAC/TACAGTCTATCGGGTTTAAGT		50/146
5	TTTTTCTTATTCTGAGGTTATC/TCATTACACCAGTTCGTCC		49/184
5	TCATGTTGCAGCAATTCAC/GAAGAGGAAAGGAAAAACATC		53/176
6	CTTCTCTTTTTTCTGTCC/AAGGATGAGAATTTCAAGCA		50/191
7	TTCCTGTGAAATAATACTGG/GAACTCTACTTTGATATCAC		50/175
7	AGTTCATGTACTTTGAGTTC/TCCCAATGAAAGTAAAGTAC		50/115
8	CAGATTGCCTTATAATAGTC/TCCTGGTATGAAGAATGTAT		50/225
8	AGGACAAAATGTTTCACTTTTGG/GTAAGTACTAGATATTCCTTGTC		50/156
8	GAAATCGATAGCATTTGCAG/ATACATACAAGTCACCAACC		52/177
9	AGATGAGTCATATTTGTGGG/ATGATCAGGTTTCATTGTCAC		52/148
9	CAGTTCAACTTCTGTAACAC/ATGGTGTTTATCCCTCTTG		50/164

^aTemperatura de unión (°C) para cada reacción. ^bNúmero de bases del producto de PCR resultante.

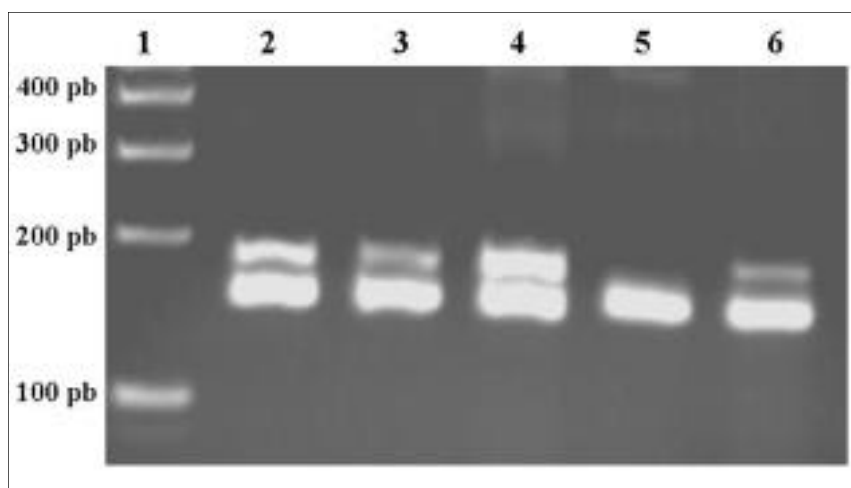


Fig. 3: Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se analiza, mediante PCR diferencial la posible existencia de delecciones homocigóticas de PTEN en meduloblastomas, mediante densitometría comparativa de las bandas de PTEN (banda superior), frente a GAPDH (banda inferior). 1: marcador de pesos moleculares; 2-4: DNA extraído a partir de sangre de donantes sanos (control negativo); 5: DNA de la línea celular A172, que presenta delección homocigótica de PTEN (control positivo); 6: DNA de un meduloblastoma, probablemente presentando delección homocigótica de PTEN (la banda de PTEN aparece marcada; tal vez a causa de la contaminación de células normales en el tumor).

PCR trae consigo un segundo problema: como estamos trabajando con DNA extraído de secciones de tumores incluidos en parafina, el DNA requiere un número de ciclos mayor de lo normal para producir bandas visibles y evaluables en geles de agarosa, ya que,

a lo largo de los años que se ha mantenido en archivo, se han degradado gran cantidad de moléculas de DNA. Por ello, a veces, se requieren 40 ciclos de PCR, para lograr amplificar DNA que se ha conservado en parafina. Pero 40 ciclos nos llevan a la fase de meseta de

la reacción de PCR, en la cual se produce una saturación en la capacidad de amplificar el DNA, tendiendo las bandas visibles a igualarse, y, por tanto, a no ser evaluables. El experimento óptimo sería aquel que nos mostrase diferencias de intensidad de las bandas correspondientes a PTEN y a GAPDH (si es que existe delección homocigótica de PTEN) al utilizar entre 25 y 30 ciclos de PCR. En muchos casos, no obstante, este número de ciclos no es suficiente para amplificar el DNA.

- Para resolver el problema de la amplificación de DNA, se estudiaron diferentes concentraciones de DNA genómico tumoral sobre el cual realizar la amplificación de PTEN y GAPDH. Finalmente se resolvió que eran necesarios 400 ng de DNA tumoral y tan sólo 25 ng de DNA de sangre para lograr bandas evaluables, lo cual explica que cuando se parte de material incluido en parafina (tumor) hay que disponer de mayor cantidad de DNA inicial que cuando se experimenta con DNA extraído de material fresco (sangre, o tumores guardados en congelación).
- Existe, además, un cierto problema de reproducibilidad en la técnica de PCR diferencial aplicada a la determinación de delecciones homocigóticas. Hemos detectado que, a pesar de haber obtenido las condiciones de amplificación que producen bandas de PTEN y GAPDH similares en intensidad en los controles negativos (sangre de donantes sanos), tales condiciones no son siempre reproducibles, produciéndose a veces una intensidad menor en la banda correspondiente a PTEN (Fig. 3). A pesar de haber diluido las muestras originales de DNA para garantizar que cada tubo presente una concentración homogénea, no hemos logrado garantizar la reproducibilidad. Ello nos lleva a

pensar que, posiblemente, la técnica de PCR diferencial presente un cierto margen de error al trabajar con un corto número de ciclos de amplificación, para garantizar que no se llega a la fase de meseta, en la cual las dos bandas tenderían a igualarse en intensidad, a pesar de existir delección homocigótica en el tumor (debido a la contaminación de células normales intratumorales y adyacentes a éste). En este sentido las nuevas técnicas de microdissección por láser⁽¹⁵⁾, pueden garantizar la separación de células tumorales y facilitar los experimentos llevados a cabo mediante PCR diferencial, al evitarse la contaminación de las células tumorales por células normales.

Hasta el momento no podemos concluir sobre el porcentaje de delecciones homocigóticas en los PNET estudiados. Los datos que se incluyen en este trabajo muestran que la técnica presenta una problemática mayor que la PCR convencional. Es deseable llegar a dominar esta técnica, hasta asegurar su reproducibilidad, puesto que casi todos los genes supresores de tumores pueden llegar a inactivarse mediante delección homocigótica. Pero contamos con realidades que dificultan la realización del estudio, como es el material parafinado en vez de fresco-congelado, y la contaminación de células normales que presentan los tumores.

CONCLUSIÓN

En conclusión, se muestran en este estudio resultados preliminares según los cuales parece que PTEN no participa en la génesis de astrocitomas pediátricos de bajo grado mediante mutaciones puntuales. Por otra parte, la técnica de PCR diferencial, útil pa-

ra la detección de delecciones homocigóticas en genes supresores de tumores, está siendo puesta a punto a fin de garantizar su reproducibilidad para el diagnóstico molecular de tumores intracraneales pediátricos.

AGRADECIMIENTOS

Jorge Muñoz, María del Mar Inda, y Xing Fan son becarios predoctorales del Gobierno de Navarra, el Ministerio de Educación y Cultura, y la Agencia Española de Cooperación Internacional, respectivamente. Este trabajo ha podido realizarse gracias a las ayudas recibidas del Departamento de Salud del Gobierno de Navarra, Fondo de Investigación Sanitaria (99/1265), Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer, y Fundación Universitaria de Navarra.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kleihues P, Cavenee WK. *Pathology and Genetics: Tumors of the Nervous System*. IARC Press, 1999, Lyon, France.
2. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997;275:1943-1947.
3. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3, that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997;15:356-362.
4. Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997;57:2124-2129.
5. Myers MP, Pass I, Batty IH, Van-der-Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks-NK. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13513-13518.
6. Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D, Parsons R. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1997;57:4183-4186.
7. Bostrom J, Cobbers JM, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifemberger G. Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res* 1998;58:29-33.
8. Liu W, James CD, Frederick L, Alderete BE, Jenkins RB. PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas. *Cancer Res* 1997;57:5254-5257.
9. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:684-689.
10. Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res* 1997;57:4187-4190.
11. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-879.
12. Castresana JS, Gómez L, García-Miguel P, Queizán A, Pestaña A. Mutational analysis of the p16 gene in human neuroblastomas. *Mol Carcinog* 1997;18:129-133.
13. Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG. Frequent coalterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999;9:469-479.
14. Fan X, Gómez L, Nistal M, Sierrasesúmaga L, Castresana JS. Differential polymerase chain reaction: a technical comparison of three methods for the detection of CDK4 gene amplification in glioblastomas. *Int J Oncol* 1998;13:963-966.
15. Curran S, McKay JA, McLeod HL, Murray GI. Laser capture microscopy. *J Clin Pathol Mol Pathol* 2000;53:64-68.